# UNTERSUCHUNGEN ZUR ADHÄSION ALS PATHOGENITÄTS-FAKTOR UND ZUR ADHÄSIONSHEMMUNG AM BEISPIEL VON INFEKTIONEN DES RESPIRATIONSTRAKTES

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

ANGELIKA MARIE ERNE

aus Biberach

~~1984~~

1983

# UNTERSUCHUNGEN ZUR ADHÄSION ALS PATHOGENITÄTS-FAKTOR UND ZUR ADHÄSIONSHEMMUNG AM BEISPIEL VON INFEKTIONEN DES RESPIRATIONSTRAKTES

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

ANGELIKA MARIE ERNE

aus Biberach

1984

| | |
|---|---|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 15. 12.1983 |
| Dekan: | Prof. Dr. E. Kulzer |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. H. Zähner |
| 2. Berichterstatter: | Priv.-Doz. Dr. R.G. Werner |

Gesamtherstellung **aku**-Fotodruck Bamberg

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0004

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen, und Herrn Priv.-Doz. Dr. R.G. Werner in der Abteilung Biologische Forschung, Mikrobiologie, der Dr. Karl Thomae GmbH durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die vielen wertvollen Diskussionen und die beständige Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Zähner herzlich bedanken.

Mein Dank gilt der Geschäftsleitung, insbesondere Herrn Prof. Dr. H. Machleidt, und Herrn Prof. Dr. R. Engelhorn, Herrn Prof. Dr. U. Mittmann und Herrn Dr. H. Goeth der Dr. Karl Thomae GmbH, die die Anfertigung dieser Arbeit in ihrem Haus ermöglichten und äußerst großzügig förderten.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. R.G. Werner, der dieser Arbeit durch ein hohes Maß an Kreativität und engagierte Diskussionsbereitschaft wichtige Impulse gab.

Mein herzlichster Dank gilt auch Herrn G. Bader, Frau H. Giorno, Fräulein U. Fischer, Herrn H. Sick, Herrn L.F. Thorpe und Frau G. Veit für ihre stetige und fachkundige Zusammenarbeit, Herrn G. Einbock für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen, Frau K. Rühr und Herrn F. Metzler für die tierexperimentellen Arbeiten, Herrn Dr. H. Ziegler und seinem Team für die Bereitstellung von Lungenwaschwasserproben, Herrn Dr. Keck, Herrn Dr. Eberlein und Herrn Dr. Nickl für die zur Verfügung gestellten Benzylamine und Thrombozytenaggregationshemmer und Herrn Dr. R. Reifenrath, Herrn Dr. Franz und Herrn Dr. Lechner für die Herstellung von Surfactant.

Allen Mitarbeitern der Mikrobiologie danke ich für ihre Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | MATERIAL UND METHODEN | 5 |
| 1. | Chemikalien | 5 |
| 2. | Mikroorganismen | 8 |
| 3. | Eukaryonten-Zellen | 8 |
| 4. | Nährmedien, Puffer, Gele und sonstige Reagenzien | 9 |
| 4.1 | MEM für Lungenepithelzellen | 9 |
| 4.2 | Kanamycinlösung für MEM | 9 |
| 4.3 | DMEM für ausdifferenzierte Makrophagen | 9 |
| 4.4 | Makrophagen-Medium | 9 |
| 4.5 | Versen-Trypsin-Lösung für Zellablösung | 10 |
| 4.6 | Trypanblue-Vitalfärbelösung für Zellzählung | 10 |
| 4.7 | Neutralrot-Färbelösung für Cytotoxizitäts-Bestimmung | 10 |
| 4.8 | EBSS für Cytotoxizitätsbestimmung | 10 |
| 4.9 | Elutionspuffer für Cytotoxizitätsbestimmung | 11 |
| 4.10 | PBS für Zellkultur und Bakterien | 11 |
| 4.11 | BHI-Medium für Klebsiella pneumoniae | 11 |
| 4.12 | BHI-Medium für Streptococcus | 11 |
| 4.13 | BHI-Medium 10 für Haemophilus influenzae | 12 |
| 4.14 | Mucin-Agar für Streptococcus pneumoniae | 12 |
| 4.15 | Levinthal-Agar für Haemophilus influenzae | 12 |
| 4.16 | Lowry-Lösung 1 für Proteinbestimmung | 13 |
| 4.17 | Lowry-Lösung 2 für Proteinbestimmung | 13 |
| 4.18 | Sammelgel für die Vertikalelektrophorese | 13 |
| 4.19 | Trenngel für die Vertikalelektrophorese | 13 |
| 4.20 | Probenpuffer für die Vertikalelektrophorese | 13 |
| 4.21 | Laufpuffer für die Vertikalelektrophorese | 13 |
| 4.22 | Coomassie blue für die Proteinfärbung | 14 |
| 4.23 | PAS-Reagentien für die Glycoproteinfärbung | 14 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 5. | Zellkultur | 14 |
| 5.1 | Subkultur der menschlichen, embryonalen Lungenepithelzellen ATCC CCL 5 L-132 | 14 |
| 5.2 | Testkultur der menschlichen, embryonalen Lungenepithelzellen ATCC CCL 5 L-132 | 15 |
| 5.2.1 | Bestimmung des Titers der lebenden Zellen | 15 |
| 5.2.2 | Einsäen der Zellen in Testgefäße | 15 |
| 5.2.3 | Einsäen der Zellen in Mikrotiterplatten | 16 |
| 5.3 | Subkultur der Knochenmarksmakrophagen | 16 |
| 5.4 | Testkultur der Knochenmarksmakrophagen | 17 |
| 6. | Cytotoxizitätsbestimmung | 18 |
| 7. | Kultur der Bakterien | 18 |
| 7.1 | Klebsiella pneumoniae ssp. | 18 |
| 7.2 | Haemophilus influenzae BC 31 | 19 |
| 7.3 | Streptococcus pneumoniae ATCC 6302 | 19 |
| 8. | Bestimmung der Colony forming units (cfu) | 20 |
| 8.1 | Aufstellen einer Korrelation zwischen Transmission und cfu | 20 |
| 8.2 | Bestimmung der cfu unter dem Einfluß potentieller Antiadhäsiva | 20 |
| 9. | Radioaktiver Adhäsionsversuch | 21 |
| 9.1 | Vorbereiten der Bakterienkultur für den Adhäsionsversuch | 21 |
| 9.2 | Adhäsionsversuch | 21 |
| 10. | Bestimmung der optimalen Adhäsionsparameter | 22 |
| 10.1 | Bakterienkonzentration und Zeitkinetik der Adhäsion | 22 |
| 10.1.1 | Klebsiella pneumoniae WG 14 | 22 |
| 10.1.2 | Haemophilus influenzae BC 31, Streptococcus pneumoniae ATCC 6302 | 22 |
| 10.2 | pH-Optimum der Adhäsion | 22 |
| 11. | Bestimmung des Pili-Index bei 6 Klebsiella pneumoniae-Klinikisolaten | 22 |
| 11.1 | Durchschnittliche Anzahl der Pili pro Bakterium | 23 |
| 11.1.1 | Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate | 23 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 11.1.2 | Auswertung der elektronenmikroskopischen Präparate | 23 |
| 11.2 | Durchschnittlicher Prozentsatz der Pili-tragenden Bakterien in einer Population | 23 |
| 11.2.1 | Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate | 23 |
| 11.2.2 | Auswertung der elektronenmikroskopischen Präparate | 23 |
| 12. | Bestimmung der Adhäsivität bei 6 Klebsiella pneumoniae-Klinikisolaten | 23 |
| 12.1 | Adhäsivität gemessen in Anzahl der Bakterien pro Epithelzelle | 24 |
| 13. | Bestimmung der in vivo-Virulenz bei 6 Klebsiella pneumoniae-Klinikisolaten | 24 |
| 13.1 | Durchführung des intranasalen Infektionsversuches | 24 |
| 13.2 | Beurteilung der Infektion nach der Keimzahl im Lungenhomogenat | 24 |
| 14. | Adhäsion nach enzymatischem Abbau des epithelialen Adhäsionsrezeptors | 25 |
| 14.1 | Cytotoxizitätsbestimmung der Enzyme | 26 |
| 14.2 | Adhäsionsversuch | 26 |
| 15. | Einfluß isolierter Pili auf die bakterielle Adhäsion | 26 |
| 15.1 | Isolierung der Pili | 26 |
| 15.1.1 | Proteinbestimmung der Pilifraktionen nach Lowry | 27 |
| 15.1.2 | Präparative Isoelektrofokussierung der Pili | 27 |
| 15.1.3 | Analytische Isoelektrofokussierung der Pili | 28 |
| 15.2 | Adhäsionsversuch | 29 |
| 16. | Bestimmung der antiadhäsiven Wirkung verschiedener Antibiotika | 29 |
| 16.1 | Antibakterielle Wirkung der Antibiotika bei Klebsiella pneumoniae WG 14 | 30 |
| 16.1.1 | Cfu unter dem Einfluß einer Konzentrationsreihe der Antibiotika der Gruppe 1 | 30 |
| 16.1.2 | MHK der Antibiotika der Gruppe 2 | 30 |

Seite

16.2 Cytotoxizitätsbestimmung der Antibiotika der Gruppe 1 30
16.3 Adhäsionsversuch 31
16.3.1 Adhäsionsversuch mit den Antibiotika der Gruppe 1 31
16.3.2 Adhäsionsversuch mit den Antibiotika der Gruppe 2 31
17. Bestimmung der antiadhäsiven Wirkung verschiedener Zucker 31
17.1 Cfu unter dem Einfluß einer Konzentrationsreihe der Zuckerderivate 32
17.2 Cytotoxizitätsbestimmung der Zuckerderivate 32
17.3 Adhäsionsversuch 32
18. Bestimmung der antiadhäsiven Wirkung von Thrombozytenaggregationshemmern 32
18.1 Cfu unter dem Einfluß einer Konzentrationsreihe der Thrombozytenaggregationshemmer 33
18.2 Cytotoxizitätsbestimmung der Thrombozytenaggregationshemmer 33
18.3 Adhäsionsversuch 33
19. Bestimmung der antiadhäsiven Wirkung verschiedener Benzylamine 34
19.1 Cfu unter dem Einfluß einer Konzentrationsreihe von Benzylaminen 34
19.2 Cytotoxizitätsbestimmung der Benzylamine 34
19.3 Adhäsionsversuch im in vitro-Modell 34
19.4 Adhäsionsversuch im ex vivo-Modell 35
19.4.1 Gewinnung von Lungenwaschwasser 35
19.4.2 Präparative Isoelektrofokussierung des Lungenwaschwassers 35
19.4.3 Adhäsionsversuch mit den Lungenwaschwasser-Fraktionen 36
19.4.4 Vertikalelektrophorese der Lungenwaschwasser-Fraktionen 36
19.4.5 Adhäsionsversuch mit den Lungenwaschwasser-Unterfraktionen 37

Seite

19.4.6 Nachweis verschiedener Enzyme in den Lungenwasch-wasser-Fraktionen und -Unterfraktionen 37
19.4.7 Nachweis der katalytischen Aktivität von α-Amylase mittels Amylopektin-Spaltung mit potentiellen Inhibitoren 38
19.5 Bestimmung des Einbaus und der Freisetzung von Fettsäuren bei verschiedenen Phospholipiden unter dem Einfluß von Benzylaminen 38
19.5.1 Vorbereiten der Arachidonsäure-Lösung 38
19.5.2 Einbau-Versuch 39
19.5.3 Feisetzungs-Versuch 39
19.5.4 Lipidextraktion und -Auftrennung aus Knochenmarksmakrophagen 39
19.6 Bestimmung der Makrophagenaktivierung durch Benzylamine 40
20. Bestimmung der antiadhäsiven Wirkung von synthetischem Surfactant 41
20.1 Herstellung des Surfactants 41
20.2 Messung des osmotischen Druckes des synthetischen Surfactants 41
20.3 Cfu unter dem Einfluß einer Konzentrationsreihe des synthetischen Surfactants 41
20.4 Cytotoxizitätsbestimmung des synthetischen Surfactants 41
20.5 Adhäsionsversuch 42
20.6 Einfluß von Surfactant auf die Epithelzellen und/oder Bakterien 42
20.7 Einfluß von Surfactant auf bereits adhärente wachsende oder statische Bakterien 43

III. ERGEBNISSE 44
1. Zahl der Lungenepithelzellen im Monolayer in Glasszintillationsfläschchen 44
2. Cfu bei verschiedenen Transmissionswerten 44

| | | Seite |
|---|---|---|
| 3. | Adhäsionsintensität von Klebsiella pneumoniae an Lungenepithelzellen | 46 |
| 4. | Bakterienkonzentration und Zeitkinetik der Adhäsion | 48 |
| 5. | pH-Optimum der Adhäsion | 49 |
| 6. | Pili-Indices von Klebsiella pneumoniae | 51 |
| 7. | Adhäsivität bei 6 Klebsiella pneumoniae-Klinikisolaten und einem Referenzstamm | 53 |
| 8. | In vivo-Virulenz von 2 Klebsiella pneumoniae-Klinikisolaten und einem Referenzstamm | 54 |
| 9. | Adhäsion nach enzymatischem Abbau epithelialer Oberflächen-Proteine | 55 |
| 10. | Einfluß isolierter Pili auf die baktertielle Adhäsion | 58 |
| 11. | Antiadhäsive Wirkung verschiedener Antibiotica | 61 |
| 12. | Antiadhäsive Wirkung verschiedener Zucker | 67 |
| 13. | Antiadhäsive Wirkung von Thrombozytenaggregationshemmern | 72 |
| 14. | Antiadhäsive Wirkung von Benzylaminen | 76 |
| 15. | Makrophagenaktivierung durch Benzylamine | 99 |
| 16. | Antiadhäsive Wirkung von synthetischem Surfactant | 100 |
| IV. | DISKUSSION | 107 |
| V. | ZUSAMMENFASSUNG | 115 |
| VI. | LITERATUR | 118 |

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

| | |
|---|---|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BC | Stammsammlung Thomae, Biberach |
| BHI | Brain-Heart-Infusion Broth |
| cfu | Colony Forming Units |
| CRP | C-reaktives Protein |
| dpm | Decays per Minute |
| DMEM | Dulbecco's Minimal Essential Medium |
| EBBS | Earle's Balanced Salt Solution |
| EDTA | Ethylenediaminetetraaceticacid |
| f.c. | Final concentration |
| HEPES | Hydroxyethylpiperazine-ethanesulfonic acid |
| IEP | Isoelektrischer Punkt |
| LSC | Liquid Scintillation Counter |
| MEM | Minimal Essential Medium |
| MG | Molekulargewicht |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| PAS | Periodic Acid-Schiff's Reagent |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| SPF | Spezifisch pathogen-frei |
| TCA | Tri-Chlor-Acetic Acid |
| TEMED | Tetramethylethylenediamine |
| Tris | tris-Hydroxymethylaminomethane |
| U | Units = Enzymeinheiten |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| WG | Stammsammlung Institut Gärtner, Weingarten |

# I EINLEITUNG

Die Adhäsion eines Mikroorganismus an die Zelloberflächen eines Makroorganismus ist der initiale Schritt auf dem Weg zur Infektion (Beachey, 1981, 1982; Gibbons, 1977; Sugarman, 1980). Die Fähigkeit zur Adhäsion bedingt gemeinsam mit der Fähigkeit zur Toxinproduktion die Virulenz eines Erregers (Beachey, 1982; Freter 1980). Die Adhäsion kann entweder grundlegende Bedingung für eine nachfolgende Invasion sein oder oberflächenbesiedelnde Erreger davor schützen, durch Körperflüssigkeiten oder Cilienmotorik ausgeschwemmt zu werden (Ofek and Beachey, 1980). Für viele pathogene Keime - invasiv oder nicht - ist die Adhäsion die Voraussetzung für die Sekretion von Toxinen (Beachey, 1982; Satterwhite et al., 1978; Sobeslavsky et al., 1968); nur so ist gewährleistet, daß die Toxine in hoher Konzentration und gezielt bestimmte Gewebe erreichen und nicht der Gefahr ausgesetzt sind, durch Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus, z.B. abbauenden Enzymen oder Antikörpern in den mukösen Flüssigkeiten, eliminiert zu werden (Force et al., 1973; Green et al., 1977).

Die Adhäsion wird vermittelt durch species- und gewebespezifische komplementäre Bindungen von Adhäsionsstrukturen der Mikroorganismen und Rezeptoren auf den Wirtszelloberflächen (Cheney et al., 1980; Ellen and Gibbons, 1974; Gibbons et al., 1976; Gibbons, 1977; Johnson et al., 1977). Bei den Adhäsionsstrukturen kann es sich um Pili handeln, wie z.B. bei den gram-negativen Keimen (Buchanan and Pearce, 1976; Cisar and Vatter, 1979; Craven and Frasch, 1978; Duguid and Gillies, 1958; Duguid, 1959; Duguid et al., 1966; Fader et al., 1979; Punsalang and Sawyer, 1973; Sato et al., 1979; Scott and Old, 1981; Silverblatt and Ofek, 1978; Svanborg-Eden and Hansson, 1978; Tweedy et al., 1968; Woods et al. 1980), oder um Fibrillen und Lipoteichonsäuren, was bei den gram-positiven Organismen zu finden ist (Beachey, 1975, 1981, 1982), oder um sonstige Protein-Strukturen der äußeren Membran (van Alphen et al.,

1983; Banai et al., 1980). Die epithelialen Rezeptoren werden von Polysacchariden, Glycoproteinen oder Glycolipiden gebildet, wobei die Zuckerreste die Spezifität bedingen (Beachey, 1981, 1982; Elbein et al., 1981; Leffler and Svanborg-Eden, 1980, 1981; Ofek et al., 1977). Die Kapazität der Epithelzellen, Mikroorganismen zu binden, wird wahrscheinlich durch autosomale, dominante Gene codiert (Sellwood et al., 1975; Fowler and Stamey, 1977; Kallenius and Winberg, 1978; Svanborg-Eden and Jodal, 1979), kann aber auch von vorausgehenden Virusinfektionen (Huang and Okorie, 1979; Looslie, 1973; Sanford et al., 1978, 1979; Selinger et al., 1981), von krankheits- und altersbedingten Zellschädigungen (Brecher and van Houte, 1979) und äußeren Faktoren, wie zum Beispiel Zigarettenrauch (Fainstein and Musher, 1979) beeinflußt werden.

Aus diesen Ligand-Rezeptor-Strukturen ergeben sich Ansatzpunkte für therapeutisch nutzbare Antiadhäsiva. So ist es möglich, mit isolierten Rezeptoren, Rezeptoranaloga oder Zuckern als Rezeptorbestandteil die Adhäsionsstrukturen der Erreger abzusättigen. Andererseits können mit isolierten Adhäsionsstrukturen oder Analoga die Rezeptoren neutralisiert werden (Beachey, 1981).

Viele Forschungsgruppen arbeiten daran, Antikörper, die gegen isolierte Liganden gebildet wurden, als Antiadhäsiva einzusetzen (Boslego et al., 1980; Brinton et al., 1980; Rutter and Jones, 1973; Sato et al., 1981; Siegal and Buchanan, 1980; Silverblatt and Cohen, 1979; Tramont et al., 1980). In der Nutztierzucht, vor allem bei Schweinen, werden bereits Muttertiere mit isolierten Pili von pathogenen E.coli-Stämmen vakziniert, die dann ihre spezifischen Antikörper auf die Jungtiere übertragen, was zu einer deutlichen Senkung der hohen Jungtiersterblichkeit führte und damit eine große wirtschaftliche Bedeutung erlangte (Acres et al., 1979; Isaacson et al., 1980; Morgan et al., 1978; Nagy et al., 1978). Großes Interesse wird auch Beobachtungen geschenkt, daß subinhibitorische Kon-

zentrationen einiger Antibiotika die Ausbildung von Adhäsionstrukturen ganz oder partiell hemmen (Alkan and Beachey, 1979; Bammann et al., 1978; Beachey et al., 1981; Davis und Savage, 1976; Eisenstein et al., 1978 a, 1978 b, 1979, 1980, 1981; Gorini, 1974; Ofek et al., 1979; Sandberg et al., 1979; Svanborg-Eden et al., 1978; Tylewska et al., 1980; Vosbeck et al., 1979).

In letzter Zeit häuften sich Befunde, wonach auch einigen anderen, nicht-antibakteriellen, chemisch synthetisierten Verbindungen eine antiadhäsive Wirkung zukommen könnte. So kann man sich vorstellen, daß Substanzen, die die Aggregation von Thrombozyten hemmen, auch die Adhäsion einer Prokaryontenzelle an eine Eukaryontenzelle hemmen können. Eine mindestens ebenso große Bedeutung kommt den Benzylaminen zu, die seit vielen Jahren als Sekretolytica eingesetzt werden. Von ihnen wird berichtet, daß sie zur Versorgung offener Wunden verwendet wurden und zu einer schnellen und komplikationslosen Heilung führten, wo sonst häufig Amputationen notwendig wurden (Pido et al., 1976; Siasco and Palillo, 1979). In der Veterinärmedizin konnte bei Kühen Mastitis unter massiver Keimausschwemmung mit der Milch erfolgreich mit Benzylaminen therapiert werden (Ziv, 1983). Eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung der Benzylamine konnte in beiden Fällen unter physiologischen Bedingungen nicht nachgewiesen werden (Assher, 1982), so daß ein anderer Wirkungsmechanismus postuliert werden muß. Weiterhin wurde unter Benzylamintherapie eine erhöhte bakterielle Clearance des Respirationstraktes beobachtet, ohne daß eine gesteigerte Cilienmotorik oder antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden konnte (Krüger, 1983).

Die Therapie mit Antiadhäsiva bietet einige Vorteile gegenüber der herkömmlichen Chemotherapie. Mit einer Resistenzentwicklung wie bei vielen Antibiotika muß nicht gerechnet werden. Auch rezividierende Keime können erfaßt werden. Endotoxin-Produzenten, die unter Umständen bei einer Antibiotika-Therapie nach der Lysis der Bakterien

innerhalb kurzer Zeit eine große Menge an Toxin freisetzen und so zu schwersten Schockreaktionen führen, können gefahrlos aus dem Körper ausgeschwemmt werden.

Die Berichte, die eine potentielle antiadhäsive Wirkung der Benzylamine vermuten lassen, sowie die Vorteile einer Antiadhäsivatherapie waren der Anlaß, im Rahmen dieser Arbeit Testmodelle zu etablieren, die neben der Prüfung verschiedener Antiadhäsiva die vorrangige Untersuchung der antiadhäsiven Wirkung von Benzylaminen ermöglichen sollte. Anwendungsbezogen für den Respirationstrakt (Andersson et al., 1981; Johanson et al., 1979, 1980; Lampe et al., 1982; Ramphal, 1982) wurden Testmodelle mit menschlichen Lungenepithelzellen und den relevantesten bakteriellen Erregern von Infektionen des Respirationstraktes, wie Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae und Streptococcus pneumoniae, sowie lokale Infektionen des Respirationstraktes in vivo entwickelt.

## II MATERIAL UND METHODEN

### 1. Chemikalien

Sofern nicht besonders aufgeführt, wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

| | |
|---|---|
| Amersham Buchler, Braunschweig | $^{14}$C-Arachidonsäure |
| Ascalia, Hamburg | Mucin |
| Bayer, Wuppertal | Nojirimycin |
| Boehringer, Mannheim | Testkids: |
| | Molekulargewichtsmarker 20 000 - 200 000 |
| | Alkalische Phosphatase |
| | Saure Phosphatase |
| | Lactatdehydrogenase |
| | Cholinesterase |
| | Amylase |
| | γ-Glutamyltranspeptidase |
| | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase |
| | Glutamat-Pyruvat-Transaminase |
| | Glutamatdehydrogenase |
| | Aldolase |
| Calbiochem, Gießen | Amylopektin Azur |
| | α-Amylase Inhibitor |
| | α-Glucosidase |
| | ß-Glucosidase |
| | Hyaluronidase |
| | Neuraminidase |
| | Kollagenase |
| | Papain |
| | Pepsin |
| | Pronase |
| | Trypsin |
| | N-Acetyl-Cystein |
| | Cephalin |
| | Lecithin |

| | |
|---|---|
| | Sphingomyelin |
| | Lysolecithin |
| | Rinderserum Albumin |
| | 2-Fluor-2-Desoxy-Glucose |
| Difco Laboraties, | BHI |
| Detroit, USA | Bactoagar |
| Eli Lilly, Gießen | Moxalactam |
| Fink, Herrenberg | Magermilchpulver |
| Flow, Meckenheim/Bonn | MEM |
| | EDTA-Trypsin |
| Fluka, Buchs, Schweiz | Hämin |
| | S-Carboxy-Methyl-Cystein |
| | Fuchsin |
| Hedinger, Stuttgart | Celit |
| Hoechst, Frankfurt | Moenomycin |
| LKB, Bromma, Schweden | Ultrodex |
| | Ampholine |
| Meiji Seika Kaisha, Tokyo, Japan | Macarbomycin |
| MPI für Immunbiologie, Freiburg | Medium aus |
| | L-Zellen-Kultur |
| NEN, Dreieich | $^{14}$C-Acetat |
| Nunc Intermed, Wiesbaden | Pferdeserum |
| | HEPES |
| Oxoid, Wesel | Fleischextrakt |
| Packard, Böblingen | Szintillationsflüssigkeit |
| Pfanstiehl, Waukegan, USA | Methyl-α-D-Glucose |
| | Phenyl-ß-D-Glucose |
| | Methyl-α-D-Mannose |
| | N-Acetyl-D-Mannosamin |
| | Methyl-α-D-Xylose |
| | Stachyose |
| | Gentibiose |
| | Trehalose |
| | Melibiose |

| | |
|---|---|
| | Turanose |
| | Arabinose |
| | Melezitose |
| | Myo-Inositol |
| Pharmacia, Frankfurt | Sephadex G 75 |
| Seromed Biochrom, Berlin | DMEM |
| | Fötales Kälberserum |
| | Kanamycin |
| | Phenolrot |
| Serva Feinbiochemica, | Anodenflüssigkeit pH 3 |
| Heidelberg | Kathodenflüssigkeit pH 10 |
| | Polyacrylamid-Gel, ultra-dünn |
| | Acrylamid |
| | Serva Blau |
| | Coomassie blue |
| | Bromphenol blau |
| | L-α-dipalmitoyl-phosphatidyl-cholin |
| | Cholesterol |
| Sigma Chemical Co., | Luminol |
| St. Louis, USA | Zymosan |
| | Mannan |
| Thomae, Biberach | AH-P 719 |
| | AH-P 827 |
| | SH 1223 |
| | SH 1242 |
| | RE 102 |
| | RE 244 |
| | Bromhexin |
| | Ambroxol |
| | NA 300 |
| | NA 611 |
| | NA 732 |
| | NA 1010 |
| | NA 1018 |

| | |
|---|---|
| | NA 1352 |
| | NA 1523 |
| | NX-AB 2180 |
| | ABA 712 |
| | AX-AB 950 |
| Weigert, Hamburg | Neodisher F, N. |
| Welding, Hamburg | Cefotaxim |
| | Neomycin |
| | Gentamycin |
| | Erythromycin |
| | Clindamycin |
| | Tetracyclin |
| | Chloramphenicol |

2. Mikroorganismen

| Bakterien | | Temperatur |
|---|---|---|
| Klebsiella pneumoniae | WG 6 | 37° C |
| " | WG 8 | 37° C |
| " | WG 10 | 37° C |
| " | WG 14 | 37° C |
| " | BC 6 | 37° C |
| " | BC 53a | 37° C |
| Streptococcus pneumoniae | ATCC 6302 | 37° C |
| Haemophilus influenzae | BC 31 | 37° C |

3. Eukaryonten-Zellen

| Zellen | | Temperatur |
|---|---|---|
| Menschliche embryonale Lungenepithelzellen | ATCC CCL5 L-132 | 37° C |
| Knochenmarks-Makrophagen aus Mäusen | | 37° C |

## 4. Nährmedien, Puffer, Gele und sonstige Reagenzien

### 4.1 MEM für Lungenepithelzellen

1 Packung MEM
12 g $NaHCO_3$
10 l aqua bidest.
pH 7,2
In 450 ml-Portionen durch 0,2 µm-Filter sterilfiltrieren,
24 Stunden bei 37° C und 24 Stunden bei 27° C inkubieren.

### 4.2 Kanamycinlösung für MEM

2,5 g Kanamycin
25 ml aqua bidest.
Durch 0,2 µm-Filter sterilfiltrieren.

### 4.3 DMEM für ausdifferenzierte Makrophagen

9,83 g DMEM
49,3 ml 7,5%iges $NaHCO_3$
950 ml aqua bidest.
pH 7,2
Durch 0,2 µm-Filter sterilfiltrieren.

### 4.4 Makrophagen-Medium

330 ml DMEM
180 ml Medium aus L-Zellen-Kultur
60 ml fötales Kälberserum
30 ml Pferdeserum
5 ml Pyruvat
1,5 ml Mercaptoäthanol
4,5 g Glucose
In 600 ml-Portionen durch 0,2µm-Filter sterilfiltrieren,
24 Stunden bei 37° C und 24 Stunden bei 27° C inkubieren.

4.5 Versen-Trypsin-Lösung für Zellablösung

2,0 g Trypsin
2,0 g EDTA (Versen)
80 g NaCl
2 g KCl
11,5 g $Na_2HPO_4$
2 g $KH_2PO_4$
10 l aqua bidest.
20 ml 0,5%iges Phenolrot
pH 7,4
Durch 0,2 µm-Filter sterilfiltrieren.

4.6 Trypanblue-Vitalfärbelösung für Zellzählung

100 mg Trypanblue
100 ml PBS pH 7,2
In Portionen zu 0,8 ml Trypanblue und 1,0 ml PBS pH 7,2 durch 0,2 µm-Filter sterilfiltrieren.

4.7 Neutralrot-Färbelösung für Cytotoxizitäts-Bestimmung

1 g Neutralrot
25 ml 96%iges Äthanol
75 ml EBSS pH 7,4
Durch Falterfilter filtrieren, dann durch 0,2 µm-Filter sterilfiltrieren.
Dunkel aufbewahren.

4.8 EBSS für Cytotoxizitätsbestimmung

200 mg $CaCl_2$
1000 mg D-Glucose
98 mg $MgSO_4$
400 mg KCl
6800 mg NaCl
140 mg $NaH_2PO_4$
1000 ml aqua bidest.
pH 7,4
Durch 0,2 µm-Filter sterilfiltrieren.

4.9 Elutionspuffer für Cytotoxizitätsbestimmung

Lösung A:
21 g Citronensäure
200 ml 1 N NaOH
1000 ml aqua bidest.

Lösung B:
0,1 N HCl
76,6 ml A + 23,4 ml B
pH 4,6
100 ml Elutionspuffer + 100 ml 96%iges Äthanol
Durch 0,2µm-Filter sterilfiltrieren.

4.10 PBS für Zellkultur und Bakterien

8 g NaCl
0,2 g KCl
1,15 g $Na_2HPO_4$
0,2 g $KH_2PO_4$
0,1 g $CaCl_2$
0,1 g $MgCl_2$
1000 ml aqua dest.
auf gewünschten pH-Wert einstellen.

4.11 BHI-Medium für Klebsiella pneumoniae

37 g BHI
1000 ml aqua dest.
pH 7,4

Für Agarplatten 1,5 % Agar zusetzen.

4.12 BHI-Medium 1 für Streptococcus

37 g BHI
10 mg Hämin*
2 mg NAD*
10 mg Histidin*
1000 ml aqua dest.
pH 7,4
* Sterilfiltration

4.13 BHI-Medium 10 für Haemophilus influenzae

37 g BHI
30 mg Hämin*
4 mg NAD*
10 mg Histidin*
1000 ml aqua dest.
pH 7,4
* Sterilfiltration

4.14 Mucin-Agar für Streptococcus pneumoniae

3,3 g Pepton
2,65 g Fleischextrakt
1,0 g NaCl — sterilisieren, auf 45° C
0,65 g $Na_2HPO_4$ — abkühlen
4,95 g Agar
330 ml aqua dest.
2,5 ml 50 %ige Glucoselösung*
0,6 g Mucin*
1,2 g Magnesiumtrisilicat*
10 g Magermilchpulver*
120 ml aqua dest.
50 ml Hammelblut*
pH 7,3
* Sterilfiltration

4.15 Levinthal-Agar für Haemophilus influenzae

7 g Pepton
5,6 g Fleischextrakt
2.1 g NaCl — sterilisieren, auf 45° C
1,4 $Na_2HPO_4$ — abkühlen
10,5 g Agar
700 ml aqua bidest.
50 ml Hammelblut*
pH 7,3
* Sterilfiltration

4.16 Lowry-Lösung 1 für Proteinbestimmung

0,8 ml 2 %ige $CuSO_4$ x 5 $H_2O$-Lösung
0,8 ml 4 %ige K-Na-tartrat x 4 $H_2O$-Lösung
38,4 ml 3 %ige $Na_2CO_3$-Lösung

4.17 Lowry-Lösung 2 für Proteinbestimmung

1 Volumenteil Folin-Ciocalteus-Reagenz
2 Volumenteile aqua bidest.

4.18 Sammelgel für die Vertikalelektrophorese

1 ml Acrylamidlösung (30 g Acrylamid + 0,8 g Bisacrylamid/100 ml)
2,5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
6,3 ml Harnstofflösung (74,5 g/100 ml)
100 µl Ammoniumpersulfatlösung (0,1 g/ml)
10 µl TEMED

4.19 Trenngel für die Vertikalelektrophorese

11,65 ml Acrylamidlösung (s.o.)
8,75 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
14,25 ml Harnstofflösung (s.o.)
350 µl Ammoniumpersulfatlösung (s.o.)
35 µl TEMED

4.20 Probenpuffer für die Vertikalelektrophorese

2,42 g Tris/HCl
30 ml Glycerin
10 mg Bromphenolblau
100 ml aqua dest.
pH 6,8

4.21 Laufpuffer für die Vertikalelektrophorese

6 g Tris/HCl
28,8 g Glycerin
1000 ml aqua bidest.
pH 8,3

4.22 Coomassie blue für die Proteinfärbung

230 mg Coomassie blue
200 ml 96 %iges Äthanol

4.23 PAS-Reagentien für die Glycoproteinfärbung

A: Schiff's Reagenz:
1 g basisches Fuchsin
100 ml aqua dest. (50° C)
20 ml 1 N HCl
Zweimal mit je 300 mg Aktivkohle 5 Minuten rühren und über Glasfilter mit Celit abfiltrieren.
6 ml A mit
130 mg K-Metabisulfit
2 Stunden bei 37° C inkubieren.

B: Periodic acid reagent:
100 µl 50 %ige Perjodsäure
10 ml 7 %ige Essigsäure

5. Zellkultur

5.1 Subkultur der menschlichen, embryonalen Lungenepithelzellen ATCC CCL 5 L-132

Die Anlage von Subkulturen erfolgte aus Kulturen, die in Kulturflaschen mit 175 $cm^2$ Grundfläche (Nunc) und 75 ml Kulturmedium (MEM, 10 % fötales Kälberserum, 0,1 % Kanamycin) über 72 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$ einen geschlossenen Monolayer (= 2,5 x $10^6$ Zellen/ml) gebildet hatten. Nach Abgießen des Kulturmediums wurden die Kulturen zweimal für einige Sekunden mit 10 ml warmer Versen-Trypsinlösung gespült und dann 3 Minuten bei 37° C inkubiert. Die so von der Flaschenwand abgelösten Zellen wurden in 10 ml 37° C warmem Kulturmedium aufgenommen. Je 1 ml davon wurde in neue Kulturflaschen mit 75 ml 37° C warmem Kulturmedium pipettiert. Die Inkubation erfolgte wiederum über 72 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$.

5.2 Testkultur der menschlichen, embryonalen Lungenepithelzellen ATCC CCL 5 L-132

5.2.1 Bestimmung des Titers der lebenden Zellen

8 ml der Zellsuspension, die bei der Anlage der Subkultur (5.1) abtrypsiniert worden waren, wurden in 8 ml Kulturmedium suspendiert. 0,2 ml davon wurden mit 1,8 ml Trypanblue-Färbelösung gemischt, in der lebende Zellen hellblau erscheinen, tote Zellen dunkelblau-violett. Durch Auszählen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mit Objektiv 16 und Phasenkontrast wurde durch Doppelbestimmung der Titer der lebenden Zellen ermittelt. Durch Verdünnen mit Kulturmedium wurde der Titer auf $7 \times 10^4$ Zellen/ml eingestellt.

5.2.2 Einsäen der Zellen in Testgefäße

Als Testgefäße dienten Szintillationsfläschchen aus Glas mit einem Bodendurchmesser von 28 mm (Wheaton). Diese waren durch folgende Vorbehandlung für die Anhaftung der Epithelzellen auf dem Glasboden vorbereitet worden: Eine Laugenspülung mit einem stark alkalischen, phosphat- und silicathaltigen, netzmittel-freien Reiniger (neo disher F); eine Säurespülung mit einem auf Phosphorsäurebasis aufbereiteten tensid-freien Reiniger (neo disher N); 12 Spülungen mit destilliertem Wasser; Sterilisation über 16 Stunden bei 180° C mit einer Aluminium-Kappe.
Mit einer Dosierspritze oder Dispensette wurden 3 ml der Testkultur mit dem Titer von $7 \times 10^4$ Zellen/ml in jedes Szintillationsgläschen abgefüllt. Während dieses Vorganges wurde die einzufüllende Testkultur ständig auf dem Magnetrührer gerührt, um ein Sedimentieren der Zellen und damit eine ungleichmäßige Verteilung zu verhindern. Die Inkubation bis zur Ausbildung eines geschlossenen Monolayers erfolgte über 72 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$. Durch Abtrypsinieren und Auszählen der Zellen aus drei Szintillationsgläschen pro Testansatz wurde die Zahl der Zellen in dem geschlossenen Monolayer ermittelt.

5.2.3 Einsäen der Zellen in Mikrotiterplatten

Es wurden Mikrotiterplatten (Best.Nr. 655180) der Firma Greiner verwendet, die aufgrund der Form und Beschichtung der Bodenfläche der Vertiefungen für adhärente Monolayerkulturen geeignet sind.
Unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer wurden 150 µl der Testkultur mit dem Titer von $7 \times 10^4$ Zellen/ml in jede Vertiefung pipettiert. Die Inkubation bis zur Ausbildung eines geschlossenen Monolayers erfolgte über 72 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$.

5.3 Subkultur der Knochenmarksmakrophagen

8 Oberschenkelknochen von Mäusen wurden an beiden Enden abgeschnitten. Mit einer Spritze mit Kanüle wurde Makrophagen-Kulturmedium aufgezogen, das durch die Knochen gespritzt wurde, so daß das Knochenmark in ein Kulturgefäß mit 16 ml Medium hineingepreßt wurde. 0,2 ml dieser gut gemischten Zell-Suspension wurden mit 1,8 ml Trypanblue-Vitalfärbelösung versetzt. Durch Auszählen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mit Objektiv 16 und Phasenkontrast wurde durch Doppelbestimmung der Titer der lebenden Zellen ermittelt und durch Verdünnen mit Kulturmedium auf $5 \times 10^4$ Zellen/ml eingestellt. Davon wurden jeweils 600 ml in äthylenoxid-sterilisierten 30 x 30 cm großen Kulturbeuteln aus Biofolie 25 (Heraeus) eingeschweißt. Darin erfolgte die Inkubation bis zur Ausdifferenzierung der Zellen über 10 Tage bei 37° C und 10 % $CO_2$.

5.4 Testkultur der Knochenmarksmakrophagen

Zum Ablösen der ausdifferenzierten Zellen wurden die Kulturbeutel (5.3) 15 Minuten auf einer Schüttelmaschine (Heidolph) geschüttelt. Diese Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 300 x g und 20° C abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde das Sediment in Kulturmedium (DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum) aufgenommen. Nach Vitalfärbung einer Probe mit Trypanblue und Auszählen der Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde der Titer der lebenden Zellen mit Kulturmedium auf $2 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Je 5 ml dieser Zellsuspension wurden in Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 60 mm (Falcon) gegossen. Zum Adhärieren der Zellen erfolgte die Inkubation über 4 Stunden bei 37° C und 10 % $CO_2$.

6. Cytotoxizitätsbestimmung

Die Kultur der Epithelzellen erfolgte wie unter 5.2.1 und 5.2.3 beschrieben. Nach Abpipettieren des Kulturmediums wurde die Kultur zweimal mit je 150 µl PBS pH 5,5 pro Mikrotiterplatten-Vertiefung gespült. 150 µl einer Lösung des zu testenden Agens wurden in jede Vertiefung pipettiert. Als Kontrolle wurde Kulturmedium verwendet und der Puffer, in dem das zu testende Agens gelöst war. Die Inkubation erfolgte über einen jeweils festgelegten Zeitraum bei 37° C und 3 % $CO_2$.
Nachdem das zu testende Agens abpipettiert worden war, wurde die Kultur zweimal mit je 150 µl PBS pH 5,5 pro Vertiefung gespült. 150 µl Neutralrot wurden in jede Vertiefung pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$ wurden die Mikrotiterplatten zur Entfernung des Farbstoffes auf Zellstoff ausgeklopft. 150 µl EBSS wurden in jede Vertiefung pipettiert und die Platten nach 1 Minute wieder ausgeklopft. Nachdem 150 µl Elutionspuffer in jede Vertiefung pipettiert worden war, wurden die Mikrotiterplatten auf einer Schüttelmaschine 15-30 Minuten geschüttelt. Die photometrische Auswertung in einem Multiscan-Gerät erfolgte bei 540 nm. Der Extinktionswert der Puffer-Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und im Vergleich zur Kulturmedium-Kontrolle beurteilt.

7. Kultur der Bakterien

7.1 Klebsiella pneumoniae ssp.

Für die Stammhaltung wurden die Bakterienstämme wöchentlich auf BHI-Agarplatten ausgestrichen, 24 Stunden bei 37° C inkubiert und dann bei 4° C aufbewahrt. Vierteljährlich wurden mit den Stämmen Tierpassagen über Mäuse vorgenommen.

Für die Testkultur wurden Reagenzgläser mit 3 ml BHI-Medium mit der Impföse angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37° C wurden 50µl dieser Kultur in Reagenzgläser mit 3 ml BHI-Medium pipettiert. Bei dieser Passage erfolgte die radioaktive Markierung mit 0,3 ml $^{14}$C-Acetat (= 3 µCi).
Inkubation: 24 Stunden bei 37° C.
Die flüssig-flüssig Passage wurde hauptsächlich zur Verbesserung der Pilibildung durchgeführt, die auf der Agarplatte geringer ist als im flüssigen Medium.

7.2 Haemophilus influenzae BC 31

Für die Stammhaltung wurde der Stamm wöchentlich auf Levinthal-Agarplatten ausgestrichen, 24 Stunden bei 37° C inkubiert und dann bei Raumtemperatur aufbewahrt.
Für die Testkultur wurden Reagenzgläser mit 3 ml supplementiertem BHI-Medium 10 mit der Impföse angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37° C wurde 1 ml dieser Kultur in Reagenzgläser mit 3 ml supplementiertem BHI-Medium 10 pipettiert und mit 0,4 ml $^{14}$C-Acetat (= 4 µCi) während einer Inkubation von 24 Stunden bei 37° C markiert.

7.3 Streptococcus pneumoniae ATCC 6302

Für die Stammhaltung wurde der Stamm wöchentlich auf Mucin-Platten ausgestrichen, 24 Stunden bei 37° C inkubiert und dann bei 4° C aufbewahrt.
Für die Testkultur wurden Reagenzgläser mit 3 ml supplementiertem BHI-Medium 1 mit der Impföse angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37° C wurden 50 µl dieser Kultur in Reagenzgläser mit 3 ml supplementiertem BHI-Medium 1 pipettiert und mit 0,3 ml $^{14}$C-Acetat (= 3 µCi) während einer Inkubation von 24 Stunden bei 37° C markiert.

8. Bestimmung der Colony forming units (cfu)

8.1 Aufstellen einer Korrelation zwischen Transmission und cfu

Die Kultur der Bakterien erfolgte wie unter 7. beschrieben, allerdings ohne radioaktive Markierung in der 2. Passage. Diese Kultur wurde 20 Minuten bei 3000 Upm (Christ) abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Sediment in 3 ml PBS resuspendiert und erneut 20 Minuten bei 3000 Upm abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Die Bakterien wurden im Photometer bei 546 nm nach $BaSO_4$ mit PBS auf Transmissionswerte von 15-95 % eingestellt. Von jedem Transmissionswert wurde eine Probe der Bakteriensuspension entnommen und bis $10^{-8}$ verdünnt. 50 µl von jeder Verdünnung wurden auf Agarplatten ausplattiert und 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach Auszählen der Kolonien wurde die Keimzahl pro ml für jeden Transmissionswert berechnet.

8.2 Bestimmung der cfu unter dem Einfluß potentieller Antiadhäsiva

Die Kultur der Bakterien erfolgte wie unter 7. beschrieben, allerdings ohne radioaktive Markierung in der 2. Passage. Nach einer Zentrifugation von 20 Minuten bei 3000 Upm und nach Entfernen des Überstandes wurde das Sediment in 3 ml PBS resuspendiert und erneut 20 Minuten bei 3000 Upm abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Die Bakterien wurden im Photometer bei 546 nm nach $BaSO_4$ mit PBS auf einen Transmissionswert eingestellt, der nach Bestimmung der Lebendkeimzahl einem Titer von $10^8$ bis $10^9$ entsprach. Danach wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert, PBS abgenommen und durch ein gleiches Volumen des zu testenden Antiadhäsivums ersetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37° C. Nach 0 und 3 Stunden, dieser Zeitraum entspricht dem Adhäsionsversuch, wurden

Proben entnommen und bis $10^{-8}$ verdünnt. 50 µl jeder Verdünnung wurden auf Agarplatten ausgespatelt und bei 37° C über 24 Stunden inkubiert. Nach Auszählen der Kolonien wurde die Keimzahl pro ml berechnet.

## 9. Radioaktiver Adhäsionsversuch

### 9.1 Vorbereiten der Bakterienkultur für den Adhäsionsversuch

Die Kultur der Bakterien erfolgte wie unter 7. beschrieben. Die radioaktiven Bakterien der 2. Passage wurden 20 Minuten bei 3000 Upm (Christ) abzentrifugiert. Zur Entfernung von nicht inkorporierter Radioaktivität und Medienresten, die ein Wachstum der Bakterien während des Adhäsionsversuches ermöglicht hätten, wurde der Medienüberstand abpipettiert, das Sediment in 3 ml PBS aufgenommen, suspendiert und erneut 20 Minuten bei 3000 Upm abzentrifugiert; dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Die Bakterien wurden im Photometer bei 546 nm nach $BaSO_4$ mit PBS auf eine Transmission eingestellt, die - nach Bestimmung der Lebendkeimzahl - einem Titer von $10^8$ bis $10^9$ entsprach.
Bei Inhibitionsversuchen wurde diese Bakteriensuspension noch einmal abzentrifugiert, PBS abgenommen und durch ein gleiches Volumen der zu testenden Inhibitorlösung ersetzt.

### 9.2 Adhäsionsversuch

Die Testkultur wurde wie unter 5.2.1. und 5.2.2. beschrieben angelegt. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde der Medienüberstand von der Zellkultur abpipettiert. Der Monolayer (= $10^6$ Zellen) wurde zur Entfernung von Medienresten zweimal mit PBS gespült und mit 1 ml Bakterien-Suspension bzw. Bakterien-Inhibitor-Suspension überschichtet. Nach einer jeweils festgesetzten Inkubationszeit bei 37° C wurden die nicht-adhärenten Bakterien abpipettiert und der Monolayer zweimal mit PBS gespült. Nach Zugabe von 12 ml Szintillationsflüssigkeit pro Szintillationsfläschchen wurde die Radioaktivität der adhärenten Bakterien im LSC gemessen.

Zusätzlich wurde die Radioaktivität eines definierten Volumens der eingesetzten Bakteriensuspension bzw. Bakterien-Inhibitor-Suspension gemessen. Damit konnte eine Korrelation Radioaktivität-Bakterientiter aufgestellt werden und so die Zahl der Bakterien pro Monolayer bzw. pro Epithelzelle berechnet werden.

10. Bestimmung der optimalen Adhäsionsparameter

10.1 Bakterienkonzentration und Zeitkinetik der Adhäsion

10.1.1 Klebsiella pneumoniae WG 14

Für die durch die Versuchsanordnung gegebene Zahl von $10^6$ Epithelzellen im Monolayer wurden Bakterien-Konzentrationen von $10^5$-$10^9$ Bakterien/ml getestet. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 9.1 und 9.2 beschrieben. Der Adhäsionsverlauf wurde über 4 Stunden verfolgt.

10.1.2 Haemophilus influenzae BC 31, Streptococcus pneumoniae ATCC 6302

Der Adhäsionsversuch dieser Keime erfolgte jeweils bei der für Klebsiella pneumoniae WG 14 optimalen Keimzahl.

10.2 pH-Optimum

Der Einfluß des pH-Wertes auf die bakterielle Adhäsion wurde im Bereich von pH 3,5-7,5 in den wie unter 9.1 und 9.2 beschriebenen Versuchsanordnungen geprüft. Klebsiella pneumoniae WG 14 wurde in einem Titer von $10^9$ Bakterien/ml eingesetzt, der Adhäsionsverlauf wurde über 3 Stunden verfolgt.

11. Bestimmung des Pili-Index bei 6 Klebsiella pneumoniae-Klinikisolaten

Untersucht wurden die Stämme Klebsiella pneumoniae WG 6, WG 8, WG 10, WG 14, BC 6, BC 53a und ATCC 10031 als Referenzstamm.

Alle elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden im Entwicklungslabor Dr. Goeth, Mikrobiologie, Thomae, von Herrn Einbock durchgeführt.

11.1 Durchschnittliche Anzahl der Pili pro Bakterium

11.1.1 Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate

Ein Tropfen Bakteriensuspension wurde auf einem vorvarbefilmten Trägernetz mit 1 %iger Phosphorwolframsäure pH 7,0 über 30 Sekunden kontrastiert. Anschließend wurden die Präparate in der Balzers Hochvakuums-Anlage BAE 080 T mit 25 Å Platin-Kohle schräg bedampft.

11.1.2 Auswertung der elektronenmikroskopischen Präparate

Die Präparate wurden in einem Zeiss EM 9 Elektronenmikroskop mit 45000facher Vergrößerung untersucht. Für jeden Stamm wurde in Wiederholungsversuchen in 20 Blickfeldern die Zahl der Pili bestimmt.

11.2 Durchschnittlicher Prozentsatz der Pili-tragenden Bakterien in einer Population

11.2.1 Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate

Die Präparation erfolgte wie unter 11.1.1 beschrieben.

11.2.2 Auswertung der elektronenmikroskopischen Präparate

Die Pili-tragenden Bakterien wurden wie unter 11.1.2 beschrieben in 20 Blickfeldern wiederholt ausgezählt.

12. Bestimmung der Adhäsivität bei 6 Klebsiella pneumoniae-Klinikisolaten

Untersucht wurden die unter 11. genannten Stämme.

12.1 Adhäsivität gemessen in Anzahl der Bakterien pro Epithelzelle

Der Adhäsionsversuch wurde wie unter 9. beschrieben bei pH 5,5 über 3 Stunden durchgeführt. Die Bakterien wurden in einer Konzentration von $10^9$ Bakterien/ml eingesetzt.

13. Bestimmung der in vivo-Virulenz bei 6 Klebsiella pneumoniae-Klinikisolaten

Die unter 11. genannten Stämme wurden im Infektions-Labor Dr. Goeth, Mikrobiologie, Thomae, von Frau Rühr und Herrn Metzler im Infektionsversuch mit Mäusen getestet.

13.1 Durchführung des intranasalen Infektionsversuches

Ein frisches Isolat der Bakterien aus der Mäuselunge wurde 24 Stunden bei 37° C auf Mucin-Agar inkubiert. Danach erfolgte eine Passage von 4 Stunden und eine weitere Passage von 12 Stunden bei 37° C in 10 ml BHI-Medium. Der Titer dieser Kultur wurde bestimmt und durch Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung auf $4 \times 10^7$ Bakterien/ml eingestellt.
Davon wurden je 0,05 ml (= $2 \times 10^6$ Bakterien) mittels einer Spritze mit abgestumpfter V2A-Kanüle Nr. 20 unter einer Inhalationsnarkose mit Chloroform in den Nasengang von weiblichen SPF-Albinomäusen appliziert. Pro Keim und Infektionszeitraum wurden 10 Mäuse infiziert.

13.2 Beurteilung der Infektion nach der Keimzahl im Lungenhomogenat

Eine Stunde nach der Infektion wurde je ein Kollektiv von Tieren mit Chloroform getötet. Die Lunge wurde entnommen und in eine sterile Teflonkapsel mit Schlagkugel gegeben. Nach Bestimmung des Lungengewichts wurde die Kapsel in einen Mikrodismembrator (Braun Melsungen) eingespannt, der 90 Sekunden bei 50 Schwingungen pro Sekunde vibrierte.

Nach Zugabe von 0,8 ml physiologischer Kochsalzlösung pro Lunge wurde nochmals 15 Sekunden geschüttelt. Von dieser Organsuspension wurden Verdünnungen angelegt. Pro Verdünnung wurden je 0,1 ml auf zwei Blutagar-Platten ausgespatelt und 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Infektion wurde nach Keimzahl pro Lunge, bezogen auf das mittlere Lungengewicht, beurteilt.

14. Adhäsion nach enzymatischem Abbau des epithelialen Adhäsionsrezeptors

Folgende Zucker-spaltende Enzyme und Proteasen wurden eingesetzt:

Tabelle 1: Enzymatische Aktivität verschiedener zuckerspaltender Enzyme und Proteasen.

| Enzym | Enzymatische Aktivität |
|---|---|
| α-Glucosidase | Hydrolysiert α-Glycoside zu Alkohol und D-Glucose. |
| ß-Glucosidase | Hydrolysiert ß-Glycoside zu Alkohol und D-Glucose |
| Hyaluronidase | Hydrolysiert die Bindungen zwischen 2-acetamido-2-desoxy-D-Glucose und D-Glucuronatresten in Hyaluronsäure. |
| Neuraminidase | Hydrolysiert terminale α-2,6-Bindungen zwischen N-Acetylneuraminsäure und 2-acetamido-2-desoxy-D-Galactose. |
| Kollagenase | Hydrolysiert Kollagen zu Peptiden. |
| Papain | Hydrolysiert Peptide, Amide und Ester bevorzugt bei Lysin, Arginin, Histidin, Glycin und Leucin. |
| Pepsin | Hydrolysiert Peptide bevorzugt bei Prolin, Tyrosin und Phenylalanin. |
| Pronase | Hydrolysiert jedes Protein zu freien Aminosäuren. |
| Trypsin | Hydrolysiert Peptide, Amide und Ester bevorzugt an der Carboxyl-Gruppe von Arginin und Lysin. |

14.1 Cytotoxizitätsbestimmung der Enzyme

Die Cytotoxizitätsbestimmung wurde wie unter 6. beschrieben durchgeführt. Die Konzentrationsreihen der zu testenden Enzyme wurden mit Kulturmedium hergestellt. Die Inkubation erfolgte über 18 Stunden.

14.2 Adhäsionsversuch

Die Monolayerkulturen wurden wie unter 5.2.1 und 5.2.2 beschrieben angelegt. Die Enzymkonzentrationen, bei denen im Cytotoxizitätstest eine Überlebensrate von 80-100 % gefunden worden war, wurden mit Kulturmedium in einem Endvolumen von 3 ml pro Szintillationsgläschen hergestellt. Diese Enzymlösungen wurden nach Entfernen des Medienüberstandes der Monolayerkulturen einpipettiert. Die Inkubation erfolgte über 18 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$.
Der Adhäsionsversuch wurde wie unter 9. beschrieben bei pH 5,5 über 3 Stunden mit einem Bakterientiter von $10^9$ Klebsiella pneumoniae/ml durchgeführt.

15. Einfluß isolierter Pili auf die bakterielle Adhäsion

15.1 Isolierung der Pili

Klebsiella pneumoniae WG 14 wurde mit einer Impföse in 1 l BHI-Medium in einen 1 l-Erlenmeyer Kolben geimpft. Die Inkubation erfolgte über 24 Stunden bei 37° C in Standkultur. Danach wurden die Bakterien bei 3000 Upm über 30 Minuten abzentrifugiert. Nach Abnehmen des Medienüberstandes wurde das Sediment in 50 ml PBS pH 5,5 aufgenommen und suspendiert. Die Bakterien wurden bei 3000 Upm über 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment in 50 ml PBS pH 5,5 resuspendiert. Das Abscheren der Pili erfolgte mit einem Sunbeam Homogenisator Stufe low über 2 Minuten. Das Homogenisat wurde bei 3000 Upm über 20 Minuten abzentrifugiert. Die Pili wurden isoliert, indem mit einer Spritze 5 ml direkt von der Flüssigkeitsoberfläche des Zentrifugats abgesaugt wurden.

Diese Pilisuspension wurde zur Entfernung eventuell vorhandener Bakterien oder - Bruchstücke durch ein 0,25 µm-Filter (Millipor) filtriert und mittels Ultrafiltration (Sartorius Ultrafiltrationsgerät) auf 250 µl aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde auf eine Sephadex G 75 Säule (12 x 0,5 cm) aufgetragen. Eluiert wurde mit 10 x 250 µl PBS pH 5,5. Jede der 10 Fraktionen wurde elektronenmikroskopisch auf den Gehalt an Pili und deren Beschaffenheit untersucht und auf ihren Proteingehalt.

15.1.1 Proteinbestimmung der Pilifraktionen nach Lowry

100 µl der Probe wurde mit 1 ml Lösung I (siehe 4.16) gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 0,1 ml Lösung II (siehe 4.17) zugegeben, gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 578 nm gegen einen Leerwert, bei dem im gleichen Versuchsansatz statt der Probe 100 µl PBS pH 5,5 eingesetzt wurde. Der Proteingehalt wurde aus einer Eichkurve abgelesen, bei der Standard-Rinderserumalbumin in einer Konzentration von 5-50 µg/100 µl PBS pH 5,5 verwendet wurde.

15.1.2 Präparative Isoelektrofokussierung der Pili

Für die präparative Isoelektrofokussierung wurde die sterilfiltrierte Pilisuspension, wie unter 15.1 beschrieben, verwendet. Die präparative Isoelektrofokussierung wurde mit einer LKB Multiphoreinrichtung durchgeführt, deren Kühlblock auf 4° C eingestellt war. Zur Herstellung des Gels wurden 96 ml Pilisuspension mit 4 g Ultrodex (LKB) gemischt. Nach Zugabe von 4 ml Ampholine pH 3,5-10 (LKB) wurde das zähflüssige Gel nochmals gut gemischt und luftblasenfrei auf eine Glasplatte (24x11 cm) mit Silikonrand gegossen. Mittels eines Ventilators wurden 40 % des Wassers abgedampft. Diese Gelplatte wurde luftblasenfrei auf den Kühlblock aufgelegt. Elektrodenstreifen (LKB) wurden entsprechend

zugeschnitten, mit Anodenflüssigkeit (Serva, pH 3) bzw. Kathodenflüssigkeit (Serva, pH 10) getränkt und auf die Gelränder aufgelegt. Die Fokussierung wurde über 18 Stunden mit 1200 V, 25 mA und 15 W durchgeführt. Nach Entfernung der Elektrodenstreifen wurde das Gel mittels einer Schablone (LKB) in 30 Fraktionen eingeteilt. Mit einer Oberflächenelektrode wurde der pH-Wert jeder Fraktion bestimmt, bevor sie von der Glasplatte genommen wurde. In Spezialfiltern (LKB) wurden die Proteine mit 2,5 ml PBS pH 5,5 pro Fraktion vom Gel eluiert. Die Eluate wurden auf pH 5,5 eingestellt. Der Proteingehalt der Eluate wurde nach Lowry (siehe 15.1.1) bestimmt. Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden elektronenmikroskopisch auf Anzahl und Beschaffenheit der Pili untersucht.

15.1.3 Analytische Isoelektrofokussierung der Pili

Für die analytische Isoelektrofokussierung wurde eine Pilifraktion von der Sephadexsäule (siehe 15.1) mit einem hohen Gehalt an Pili verwendet.
Die analytische Isoelektrofokussierung wurde mit einer LKB Multiphoreinrichtung durchgeführt. Nachdem der Kühlblock auf 4° C abgekühlt war, wurde eine Polyacrylamidgel-Platte (Ultradünn, pH 3-10, Serva) luftblasenfrei aufgelegt. Elektrodenstreifen (LKB) wurden entsprechend zugeschnitten, mit Anodenflüssigkeit (Serva, pH 3) bzw. Kathodenflüssigkeit (Serva, pH 10) getränkt und auf die Gelränder aufgelegt. Das Gel wurde über 30 Minuten mit 300 V, 5 mA und 4,5 W vorfokussiert. Danach wurden Applikationspapierstreifen von 0,5 $cm^2$ (LKB) auf das Gel aufgelegt und mit 15 µl Pilifraktion (Mindestproteingehalt 1 mg/ml nach Aufkonzentrierung) getränkt. Die Fokussierung wurde über 90 Minuten mit 1200 V, 5 mA und 4,5 W durchgeführt. Nach Entfernung der Elektroden- und Applikationsstreifen wurde die Gelplatte 30 Minuten in 5%iger TCA fixiert.

Anschließend wurde sie mit Methanol-Eisessig-Wasser (40:10:50) gespült, mit 0,5 %igem Serva Blau R (gelöst in Methanol-EisessigWasser 40:10:50) für 5 Minuten gefärbt, mit MethanolEisessig-Wasser (40:10:50) entfärbt bis der Untergrund hell war und dann getrocknet.
Die Position der blauen Proteinbanden zwischen Anode (pH 3) und Kathode (pH 10) wurde exakt ausgemessen, in ein vorgegebenes Diagramm mit pH-Gradienten (LKB) eingezeichnet und daraus der zugehörige isoelektrische Punkt abgelesen.

15.2 Adhäsionsversuch

Nach Abpipettieren des Medienüberstandes wurden die Monolayerkulturen zweimal mit PBS pH 5,5 gespült und je mit 14,7 µg Protein/ml aus den Fraktionen von der Sephadex-Säule, die Pili von Klebsiella pneumoniae WG 14 enthielten, 3 Stunden inkubiert. Nach Abpipettieren der Pili-Suspension wurden die Monolayerkulturen zur Entfernung nicht gebundener Pili zweimal mit PBS pH 5,5 gespült. Jeweils einer der unter 11. genannten 6 Klebsiella pneumoniae-Stämme wurde in einer Konzentration von $10^9$ Bakterien/ml in zweifachem Ansatz dazupipettiert. Die Durchführung des Adhäsionsversuches erfolgte wie unter 9. beschrieben bei pH 5,5 über 3 Stunden.

16. Bestimmung der antiadhäsiven Wirkung verschiedener Antibiotica

Es wurden folgende Antibiotica getestet:

Gruppe 1: Antibiotica, die aufgrund einer Zuckerkomponente als Rezeptoranaloga antiadhäsiv wirken könnten:
Moenomycin, Macarbomycin, Nojirimycin.

Gruppe 2: Antibiotica, die aufgrund einer Beeinflussung der Bakterienultrastruktur subinhibitorisch antiadhäsiv wirken könnten:
Cefotaxim, Moxalactam, Neomycin, Gentamycin, Erythromycin, Clindamycin, Tetracyclin, Chloramphenicol.

16.1 Antibakterielle Wirkung der Antibiotika bei Klebsiella pneumoniae WG 14

16.1.1 Cfu unter dem Einfluß einer Konzentrationsreihe der Antibiotika der Gruppe 1

Lösungen der Antibiotika wurden in einem Konzentrationsbereich von 0-100 µg/ml mit PBS pH 5,5 hergestellt. Die Bestimmung der cfu erfolgte wie unte 8.2 beschrieben.

16.1.2 MHK der Antibiotika der Gruppe 2

Die Kultur der Bakterien erfolgte wie unter 7. beschrieben, allerdings ohne radioaktive Markierung in der 2. Passage. Die Antibiotika-Konzentrationen wurden mit PBS pH 5,5 so hergestellt, daß durch Zugabe von 100 µl Antibiotika-Lösung zu 3 ml Bakterienkultur während der zweiten Passage Endkonzentrationen von 0,0038-1000 µg/ml erreicht wurden.
Die Inkubation erfolgte über 24 Stunden bei 37° C. Danach wurden von den beiden Antibiotika-Konzentrationen, wo makroskopisch gerade kein Wachstum mehr sichtbar war und von den beiden darauffolgenden, wo gerade eben Wachstum feststellbar war, Keimzählungen durchgeführt.

16.2 Cytotoxizitätsbestimmung der Antibiotika der Gruppe 1

Die Cytotoxizitätsbestimmung erfolgte wie unter 6. beschrieben. Die Konzentrationen 0-100 µg/ml wurden mit PBS pH 5,5 hergestellt. Die Inkubation erfolgte über 3 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$.

16.3 Adhäsionsversuch

16.3.1 Adhäsionsversuch mit den Antibiotika der Gruppe 1

Die Vorbereitung der Bakterienkultur erfolgte wie unter 9.1 beschrieben. Die Bakterien, die im Photometer mit PBS pH 5,5 auf einen geeigneten Transmissionswert eingestellt worden waren, wurden abzentrifugiert. PBS wurde abgenommen und durch ein gleiches Volumen Antibiotika-Lösung ersetzt, die in dem Konzentrationsbereich von 0-100 µg/ml mit PBS pH 5,5 hergestellt worden war. Je 1 ml dieser Antibiotika-Bakterien-Suspension wurde sofort auf eine Monolayerkultur pipettiert, nachdem diese zweimal mit PBS pH 5,5 gespült worden war. Die Durchführung des Adhäsionsversuchs erfolgte wie unter 9.2 beschrieben bei pH 5,5 über 3 Stunden mit einem Bakterientiter von $10^9$.

16.3.2 Adhäsionsversuch mit den Antibiotika der Gruppe 2

Die Kultur der Bakterien erfolgte wie unter 7. beschrieben. Allerdings wurden die Bakterien bei der zweiten Passage in Antibiotika-haltiges BHI-Medium (1/2, 1/4 und 1/8 MHK) transferriert und 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Dann erfolgte der Adhäsionsversuch wie unter 9.1 und 9.2 beschrieben bei pH 5,5 über 3 Stunden mit einem Bakterientiter von $10^9$.

17. Bestimmung der antiadhäsiven Wirkung verschiedener Zucker

Getestet wurden folgende Zucker:
Methyl-α-D-Glucose, 2-Fluor-2-Desoxy-Glucose, Phenyl-ß-D-Glucose.
Methyl-α-D-Mannose, Mannan, N-Acetyl-D-Mannosamin.
Methyl-α-D-Xylose.
Arabinose.
Myo-Inositol.
Stachyose, Gentibiose, Trehalose, Melibiose, Turanose, Melezitose.

17.1 Cfu unter dem Einfluß einer Konzentrationsreihe der Zuckerderivate

Lösungen der Zucker wurden in einem Konzentrationsbereich von 0-50 µg/ml mit PBS pH 5,5 hergestellt. Die Bestimmung der cfu erfolgte wie unter 8.2 beschrieben.

17.2 Cytotoxizitätsbestimmung der Zuckerderivate

Die Cytotoxizitätsbestimmung erfolgte wie unter 6. beschrieben. Die Zuckerkonzentrationen wurden in einem Bereich von 0-50 µg/ml mit PBS pH 5,5 hergestellt. Die Inkubation erfolgte über 3 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$.

17.3. Adhäsionsversuch

Die Vorbereitung der Bakterienkultur erfolgte wie unter 9.1 beschrieben. Die Bakterien, die im Photometer mit PBS pH 5,5 auf einen geeigneten Transmissionswert eingestellt worden waren, wurden abzentrifugiert. PBS wurde abgenommen und durch ein gleiches Volumen Zuckerlösung ersetzt, die in einem Konzentrationsbereich von 0-50 µg/ml mit PBS pH 5,5 hergestellt worden war. Je 1 ml dieser Zucker-Bakterien-Suspension wurde sofort auf eine Monolayerkultur pipettiert, nachdem diese zweimal mit PBS pH 5,5 gespült worden war. Der Adhäsionsversuch erfolgte wie unter 9.2 beschrieben bei pH 5,5 über 3 Stunden mit einem Bakterientiter von $10^9$.

18. Bestimmung der antiadhäsiven Wirkung von Thrombozytenaggregationshemmern

Getestet wurden folgende Substanzen:

1. Prostaglandin $I_2$-Aktivatoren:
   AH-P 827
   SH 1223

2. Phosphodiesterase-Inhibitoren:
   AH-P 719
   SH 1242
3. Adenosinaufnahme-Inhibitoren
   RE 102
   RE 244

18.1 Cfu unter dem Einfluß einer Konzentrationsreihe der Thrombozytenaggregationshemmer

Lösungen der Thrombozytenaggregationshemmer wurden in einem Konzentrationsbereich von 0-100 µg/ml mit PBS pH 5,5 hergestellt. Die Bestimmung der cfu erfolgte wie unter 8.2 beschrieben.

18.2 Cytotoxizitätsbestimmung der Thrombozytenaggregationshemmer

Die Cytotoxizitätsbestimmung erfolgte wie unter 6. beschrieben. Die Thrombozytenaggregationshemmer-Konzentrationen wurden in einem Bereich von 0-100 µg/ml mit PBS pH 5,5 hergestellt. Die Inkubation erfolgte über 3 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$.

18.3 Adhäsionsversuch

Die Vorbereitung der Bakterienkultur erfolgte wie unter 9.1 beschrieben. Die Bakterien, die im Photometer mit PBS pH 5,5 auf einen geeigneten Transmissionswert eingestellt worden waren, wurden abzentrifugiert. PBS wurde abgenommen und durch ein gleiches Volumen Thrombozytenaggregationshemmer-Lösung ersetzt, die in einem Konzentrationsbereich von 0-100 µg/ml mit PBS pH 5.5 hergestellt worden war. Je 1 ml dieser Thrombozytenaggregationshemmer-Bakterien-Suspension wurde sofort auf eine Monolayerkultur pipettiert, nachdem diese zweimal mit PBS pH 5,5 gespült worden war. Ansonsten erfolgte der Adhäsionsversuch wie unter 9.2 beschrieben bei pH 5,5 über 3 Stunden mit einem Bakterientiter von $10^9$.

19. Bestimmung der antiadhäsiven Wirkung verschiedener Benzylamine

Getestet wurden Bromhexin-Hydrochlorid [N-methyl-N-(2-amino-3,5-dibrom-benzyl)-cyclohexylamin-hydrochlorid], Ambroxol-Hydrochlorid [N-(2-amino-3,5-dibrom-benzyl)-trans-4-hydroxy-cyclohexylamin-hydrochlorid].

Na 300
Na 1010
Na 1523
Na 1018
Na 1352
ABA 712
AX-AB 950
Na 732
Na 611
NX-AB 2180

19.1 Cfu unter dem Einfluß einer Konzentrationsreihe von Benzylaminen

Die Lösungen der Benzylamine wurden in einem Konzentrationsbereich von 0-100 µg/ml mit einer 0,25 M Sorbitlösung pH 5,5 hergestellt. Die Bestimmung der cfu erfolgte wie unter 8.2 beschrieben.

19.2 Cytotoxizitätsbestimmung der Benzylamine

Die Cytotoxizitätsbestimmung erfolgte wie unter 6. beschrieben. Die Benzylamin-Konzentrationen wurden in einem Bereich von 0-100 µg/ml mit 0,25 M Sorbitlösung pH 5,5 hergestellt. Die Inkubation erfolgte über 3 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$.

19.3 Adhäsionsversuch im in vitro-Modell

Die Vorbereitung der Bakterienkultur erfolgte wie unter 9.1 beschrieben. Die Bakterien, die im Photometer mit

0,25 M Sorbitlösung pH 5,5 auf einen geeigneten Transmissionswert eingestellt worden waren, wurden abzentrifugiert. Sorbit wurde abgenommen und durch ein gleiches Volumen Benzylaminlösung ersetzt, die in einem Konzentrationsbereich von 0-100 µg/ml mit 0,25 M Sorbitlösung pH 5,5 hergestellt worden war. Je 1 ml dieser Benzylamin-Bakterien-Suspension wurde sofort auf eine Monolayerkultur pipettiert, nachdem diese zweimal mit PBS pH 5,5 gespült worden war. Ansonsten erfolgte der Adhäsionsversuch wie unter 9.2 beschrieben bei pH 5,5 über 3 Stunden mit einem Bakterientiter von $10^9$.

19.4 Adhäsionsversuch im ex vivo-Modell

Der tierexperimentelle Teil dieses Versuchs wurde im Labor Dr. Ziegler, Pharmakologie C, Thomae, von Frau Thomas durchgeführt.

19.4.1 Gewinnung von Lungenwaschwasser

Männliche SPF-Ratten wurden über 5 Tage per os mit einer Tagesdosis von 200 mg/kg Körpergewicht mit Benzylaminen behandelt. Danach wurde eine Bronchoalveolar-Lavage der Tiere mit 0,3 M Harnstoff-Lösung vorgenommen, in der Weise, daß das Lungensekret quantitativ mit 3 ml Harnstoff-Lösung pro Tier gewonnen wurde.
Das Lungenwaschwasser von einem Kollektiv von Tieren wurde gepoolt und sofort in Eis gestellt.

19.4.2 Präparative Isoelektrofokussierung des Lungenwaschwassers

Die präparative Isoelektrofokussierung wurde unmittelbar nach Gewinnung des Lungenwaschwassers bei 4° C mit einer LKB Multiphoreinrichtung durchgeführt.
Zur Herstellung des Gels wurden 96 ml Lungenwaschwasser mit 4 g Ultrodex (LKB) gemischt. Nach Zugabe von 4 ml Ampholine pH 3,5-10 (LKB) wurde das zähflüssige Gel nochmals gut gemischt und luftblasenfrei auf eine Glasplatte (24 x 11 cm) mit Siliconrand gegossen. Mittels eines Ventilators wurden 40 % des Wassers abgedampft.

Diese Gelplatte wurde luftblasenfrei auf den Kühlblock aufgelegt. Elektrodenstreifen (LKB) wurden entsprechend zugeschnitten, mit Anodenflüssigkeit (Serva pH 3) bzw. Kathodenflüssigkeit (Serva, pH 10) getränkt und auf die Gelränder aufgelegt. Die Fokussierung wurde über 18 Stunden mit 1200 V, 25 mA und 15 W durchgeführt.
Nach Entfernen der Elektrodenstreifen wurde das Gel mittels einer Schablone (LKB) in 30 Fraktionen eingeteilt. Mit einer Oberflächenelektrode wurde der pH-Wert jeder Fraktion bestimmt, bevor sie von der Glasplatte genommen wurde. In Spezialfiltern (LKB) wurden die Proteine mit 3 ml PBS pH 5,5 vom Gel eluiert. Die Eluate wurden auf pH 5,5 eingestellt.

19.4.3 Adhäsionsversuch mit den Lungenwaschwasser-Fraktionen

Die Vorbereitung der Bakterienkultur erfolgte wie unter 9.1 beschrieben. Die Bakterien, die im Photometer mit PBS pH 5,5 auf einen geeigneten Transmissionswert eingestellt worden waren, wurden abzentrifugiert. PBS wurde abgenommen und durch ein gleiches Volumen Lungenwaschwasserfraktion ersetzt. Als Kontrollen dienten 0,3 M Harnstoff-Lösung und PBS pH 5,5. Die Inkubation erfolgte über 2 Stunden bei 37° C.
Danach wurden die Bakterien wieder abzentrifugiert und Lungenwaschwasserfraktionen bzw. Kontrollen entfernt. Das Sediment wurde im gleichen Volumen PBS pH 5,5 resuspendiert. Je 1 ml dieser Bakteriensuspension wurde auf eine Monolayerkultur pipettiert, nachdem diese zweimal mit PBS pH 5,5 gespült worden war. Ansonsten erfolgte der Adhäsionsversuch wie unter 9.2 beschrieben bei pH 5,5 über 3 Stunden mit einem Bakterientiter von $10^9$.

19.4.4 Vertikalelektrophorese der Lungenwaschwasser-Fraktionen

1,5 ml jeder Fraktion aus der präparativen Isoelektrofokussierung wurden mittels Ultrafiltration auf 100 µl aufkonzentriert und mit 200 µl Probenpuffer vermischt. Diese 300 µl Probe wurden auf 5 Portionen verteilt, so daß 60 µl Probe pro Slot aufgetragen werden konnten.

Parallel dazu wurden Molekulargewichts-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 2500 V, 90 mA und 100 W durchgeführt.
Die Elektrophorese wurde dann abgebrochen, wenn der Bromphenolblau-Marker aus dem Probenpuffer die untere Glaskante erreicht hatte. Mit einer der fünf aufgetrennten Proben wurde eine Proteinfärbung mit Coomassie-Blue, mit der zweiten eine Glycoproteinfärbung mittels PAS-Reaktion durchgeführt.
Die restlichen drei aufgetrennten Proben wurden nach Abtrennen des Sammelgels mit einer Schablone (LKB) in zehn Unterfraktionen aufgeteilt. Jede Unterfraktion wurde mit 1,8 ml PBS pH 5,5 versetzt und 30 Sekunden im Omnimixer (DuPont Instruments) gemixt. Das Gel wurde über 30 Minuten bei 4500 Upm abzentrifugiert.

19.4.5 Adhäsionsversuch mit den Lungenwaschwasser-Unterfraktionen

Der Adhäsionsversuch erfolgte wie unter 19.5.3 beschrieben. Als Kontrollen dienten 0,3 M Harnstofflösung und PBS pH 5,5, die unter den gleichen Versuchsbedingungen der Vertikalelektrophorese unterzogen worden waren.

19.4.6 Nachweis verschiedener Enzyme in den Lungenwaschwasser-Fraktionen und -Unterfraktionen

Die Untersuchung erfolgte mit käuflich erhältlichen Test-Kids nach Anweisung des Herstellers.

Enzyme:
- Alkalische Phosphatase
- Saure Phosphatase
- Lactatdehydrogenase
- Cholinesterase
- Aldolase
- Amylase
- Glutamat-Pyruvat-Transaminase
- Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
- Glutamatdehydrogenase
- γ-Glutamyltransferase

19.4.7 Nachweis der katalytischen Aktivität von α-Amylase mittels Amylopektin-Spaltung mit potentiellen Inhibitoren

Für die Substratlösung wurden 2,25 g Amylopektin Azur in 100 ml destilliertem Wasser gelöst, mit dem Zusatz von 0,276 g $NaH_2PO_4$ und 0,293 g NaCl. 800 µl dieser Lösung wurden mit 100 µl amylasehaltiger Probe (30 U/ml f.c.) und 100 µl Inhibitor-Lösung (0 - 5.000 µg/ml f.c.) 10 Minuten im 37° C-Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurden zum Ausfällen des Enzyms 400 µl 18 %ige Essigsäure zugemischt. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten in einer Eppendorfzentrifuge wurde der Überstand im Photometer bei 595 nm gemessen. Für den Leerwert wurde derselbe Versuchsansatz gemacht, allerdings wurde die Essigsäure vor der Probe dazugegeben. Als Differenz der Probenextinktion und der Leerwertextinktion wurde ein ΔE-Wert berechnet.

19.5 Bestimmung des Einbaus und der Freisetzung von Fettsäuren bei verschiedenen Phospholipiden unter dem Einfluß von Benzylaminen

Diese Versuche wurden im Labor Dr. Ferber am Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg, an Knochenmarksmakrophagen durchgeführt.

19.5.1 Vorbereiten der Arachidonsäure-Lösung

$C_1$-markierte Arachidonsäure wurde mit Toluol auf 1 µCi/ml (= 19nM/ml) verdünnt. Diese Stammlösung wurde bei -20° C aufbewahrt. Vor Versuchsbeginn wurde das Toluol am Rotationsverdampfer bei 30° C abgedampft. Der Rückstand wurde mit Kulturmedium (DMEM und 10% fötales Kälberserum), das die Benzylamine in einer Konzentration von 100 µg/ml enthielt, auf 0,05 µCi/ml verdünnt. Die Liposomenbildung wurde mit Ultraschall über 3 Minuten (Branson sonifier, Stufe 3) im Eis erzielt.

19.5.2 Einbau-Versuch

Die Testkultur wurde wie unter 5.4 beschrieben angelegt. Das Kulturmedium der ausdifferenzierten adhärenten Zellen wurde abgesaugt und durch 2 ml Medium ersetzt, das radioaktive Arachidonsäure mit und ohne Benzylamin enthielt. Der Einbau der Fettsäure fand über 20 Stunden bei 37° C und 10 % $CO_2$ statt. Danach wurde das Medium abgesaugt. Zur Entfernung nicht eingebauter Fettsäuren wurden 5 ml 0,5%ige Albuminlösung aufpipettiert und nach 5 Minuten wieder abgesaugt. Dann wurden 2 ml Kulturmedium (DMEM und 10% fötales Kälberserum) einpipettiert.

19.5.3 Freisetzungs-Versuch

Der Einbau der radioaktiv markierten Arachidonsäure fand wie unter 19.4.2 beschrieben statt. Auf die adhärenten Zellen, die nach dem Einbau der radioaktiven Fettsäure gewaschen worden waren, wurden 2 ml Kulturmedium pipettiert, das die Benzylamine in einer Konzentration von 100 µg/ml enthielt. Die Freisetzung der Fettsäure fand über 20 Stunden bei 37° C und 10 % $CO_2$ statt.

19.5.4 Lipidextraktion und -Auftrennung aus Knochenmarksmakrophagen

Die Kulturplatten vom Einbau-Versuch (19.4.2) und vom Freisetzungs-Versuch (19.4.3) wurden zum Ablösen und Aufbrechen der Zellen auf Eis gestellt. Danach wurde die Zellsuspension von jeder Platte (2 ml) in 20 ml Methanol : Chloroform 1:1 aufgenommen. Zur späteren Sichtbarmachung der aufgetrennten, schwach konzentrierten, markierten Phospholipide wurden 0,2 ml eines hoch konzentrierten, nicht markierten Gemisches der gesuchten Phospholipide hinzugefügt. Dazu wurden 10 ml Methanol : Chloroform 1:1 gegeben, dann mit 5 ml 0,1M KCl-Lösung geschüttelt. Nach 10 Minuten bei 4° C wurde

durch kurzes Erwärmen unter fließendem Wasser eine klare Phasenausbildung erzielt. Nach Entfernen der wässrigen Phase und Zugabe von Siedesteinen wurde unter dem Abzug im kochenden Wasserbad das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wurde als 3 cm breiter Streifen auf eine Kieselgelplatte (45 g Kieselgel/100 ml 0,07%-iger Tylose; 1 Stunde bei 100° C aktiviert) aufgetragen. Als Fließmittel wurde Methanol : Chloroform : Wasser 40:65:10 verwendet. Danach wurde unter dem Abzug das Fließmittel abgedampft. Zur Anfärbung der aufgetrennten Fraktionen - verstärkt durch die hinzugefügten konzentrierten, nicht markierten Phospholipide - wurde die Kieselgelplatte in eine Jodkammer gestellt. Die gelb gefärbten Fraktionen wurden angezeichnet und danach zur Entfärbung über Nacht in den Abzug gestellt. Dann wurden die angezeichneten Fraktionen ausgekratzt, in Szintillationsfläschchen gegeben und nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit gemessen.

19.6 Bestimmung der Makrophagenaktivierung durch Benzylamine

Die Kultur der Makrophagen erfolgte wie unter 5.3 und 5.4 beschrieben, allerdings wurden die ausdifferenzierten Zellen mit dem Titer von $2x10^5$ Zellen/ml in Plastikszintillationsgläschen (5 ml/Glas) gegeben. Danach wurde als Verstärkersubstanz pro Glas 50 µl Luminol-Lösung (2 mg Luminol, 1 ml PBS, 8 µM Triäthylamin, ultrabeschallt) zugesetzt. Nach 10 Minuten wurden pro Glas 10 µl Benzylaminlösung (200 µg/ml f.c.) einpipettiert. Als Referenzsubstanz diente Zymosan (50 mg/ml). Die Messung erfolgte im Biolumat LB 9505 (Berthold) bei 37° C über 1 Stunde mit 60 Meßwerten, die als Kurve ausgedruckt wurden, um sowohl den zeitlichen Verlauf der Aktivierung zu bestimmen, wie auch das Gesamtmaß der Aktivierung durch Integration der Fläche unter den Kurven.

20. Bestimmung der antiadhäsiven Wirkung von synthetischem Surfactant

20.1 Herstellung des Surfactant

16 g L-α-dipalmitoyl-phosphatidylcholin und 4 g Cholesterol wurden in 5 ml Chloroform gelöst. Durch Zugabe von 100 ml destilliertem Wasser wurde eine Suspension hergestellt. Durch Behandlung mit Ultraschall über 5 Stunden wurde das Chloroform entfernt und ein Liposomendurchmesser von etwa 100 nm erzielt.

20.2 Messung des osmotischen Druckes des synthetischen Surfactant

Von der Stammlösung des Surfactant mit 200 mg Lipid pro ml wurde mittels PBS pH 5,5 eine Verdünnungsreihe bis 100 ng/ml hergestellt. Der osmotische Druck dieser Verdünnungen wurde in einem Halbmikro-Osmometer (Knauer) nach Vorschrift des Herstellers bestimmt.

20.3 Cfu unter dem Einfluß einer Konzentrationsreihe des synthetischen Surfactant

Verdünnungen des synthetischen Surfactant wurden in einem Lipidkonzentrationsbereich von 0-200 mg/ml mit PBS pH 5,5 hergestellt. Die Bestimmung der cfu erfolgte wie unter 8.2 beschrieben.

20.4 Cytotoxizitätsbestimmung des synthetischen Surfactant

Die Cytotoxizitätsbestimmung erfolgte wie unter 6. beschrieben. Die Surfactant-Verdünnungen wurden in einem Bereich von 0-200 mg Lipid pro ml mit PBS pH 5,5 hergestellt. Die Inkubation erfolgte über 3 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$.

20.5 Adhäsionsversuch

Die Vorbereitung der Bakterienkultur erfolgte wie unter 9.1 beschrieben. Die Bakterien, die im Photometer mit PBS pH 5,5 auf einen geeigneten Transmissionswert eingestellt worden waren, wurden abzentrifugiert. PBS wurde abgenommen und durch ein gleiches Volumen Surfactant ersetzt, von dem Verdünnungen in einem Lipid-Konzentrationsbereich von 0-200 mg/ml mit PBS pH 5,5 hergestellt worden waren. Je 1 ml dieser Surfactant-Bakterien-Suspension wurde sofort auf eine Monolayerkultur pipettiert, nachdem diese zweimal mit PBS pH 5,5 gespült worden war. Ansonsten erfolgte der Adhäsionsversuch wie unter 9.2 beschrieben bei pH 5,5 über 3 Stunden mit einem Bakterientiter von $10^9$.

20.6 Einfluß von Surfactant auf die Epithelzellen und/oder Bakterien

Es wurden folgende Versuchsanordnungen gewählt:

a) Die Bakterien wurden vorinkubiert.
b) Die Epithelzellen wurden vorinkubiert.
c) Beide wurden getrennt vorinkubiert.
a-c) Surfactant wurde nach der Vorinkubation entfernt
d) Keine Vorinkubation
e) Die Bakterien wurden vorinkubiert.
f) Die Epithelzellen wurden vorinkubiert.
g) Beide wurden getrennt vorinkubiert.
d-g) Surfactant wurde zusätzlich zugefügt, wenn Epithelzellen und Bakterien zusammengegeben wurden.

Die Vorinkubation mit Surfactant erfolgte direkt vor dem Adhäsionsversuch über 1,5 Stunden bei 37° C mit 30 mg Lipid pro ml. Der Adhäsionsversuch wurde wie unter 20.5 beschrieben durchgeführt.

20.7 Einfluß von Surfactant auf bereits adhärente wachsende oder statische Bakterien

Der Adhäsionsversuch wurde wie unter 9. beschrieben bei pH 5,5 über 1,5 Stunden mit einem Bakterientiter von $10^9$ durchgeführt. Nach Entfernung der nicht-adhärenten Bakterien wurden die Monolayer-Kulturen mit den adhärenten Bakterien mit 1 ml Surfactant (30 mg Lipid/ml) überschichtet, das für die wachsenden Bakterien mit BHI-Medium hergestellt worden war, für die statischen Bakterien mit PBS pH 5,5. Als Kontrollen dienten BHI und PBS. Die Inkubation erfolgte über 3 Stunden bei 37° C. Danach wurden erneut die nicht-adhärenten Bakterien entfernt, deren Radioaktivität ebenso wie die der noch adhärenten Bakterien gemessen wurde.

## III ERGEBNISSE

### 1. Zahl der Lungenepithelzellen im Monolayer in Glasszintillationsfläschchen

Um eine Aussage über die Adhäsivität, das heißt die Zahl der Bakterien pro Monolayer bzw. pro Epithelzelle, machen zu können, wurde von jedem Testkulturansatz durch Abtrypsinieren und Auszählen der Zellen aus drei Szintillationsfläschchen die Zellzahl im geschlossenen Monolayer ermittelt (II, 5.2.2). Bei einem Bodendurchmesser der Fläschchen von 28 mm und einer Einsaat von $2{,}1 \times 10^5$ Zellen lag nach einer Inkubation von 72 Stunden bei 37° C und 3 % $CO_2$ die Zahl der Zellen im geschlossenen Monolayer konstant bei $1 \times 10^6$.

### 2. Cfu bei verschiedenen Transmissionswerten

Für Klebsiella pneumoniae WG 14, Haemophilus influenzae BC 31 und Streptococcus pneumoniae ATCC 6302 wurden bei Transmissionswerten von 15 - 95 % die cfu bestimmt (II, 8.1), um für die Adhäsionsversuche eine schnelle Methode zu haben, die radioaktiv markierten Bakterien auf den gewünschten Titer einzustellen. Gemäß der Zellgröße dieser Keime war das photometrische Verhalten sehr unterschiedlich, wie aus Abbildung 1 zu ersehen ist.

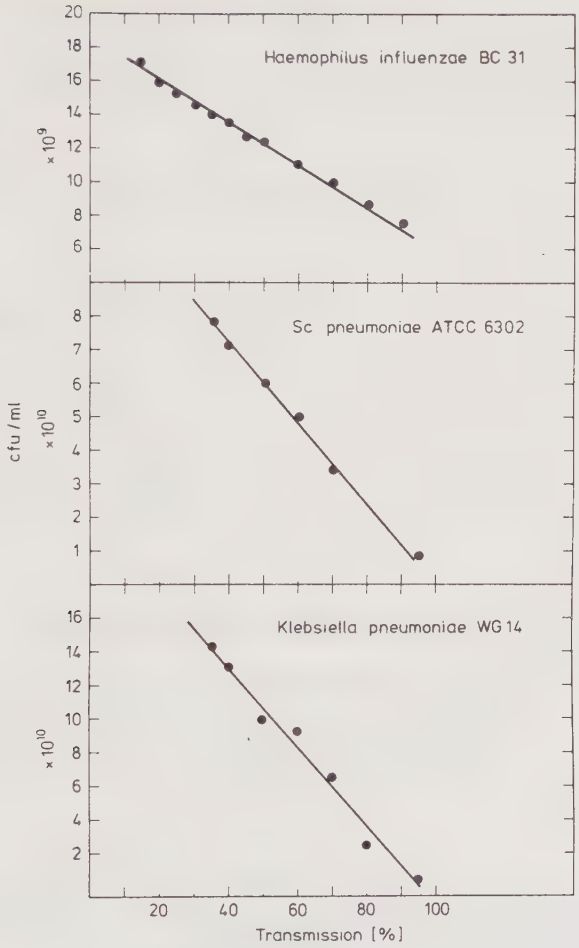



Abbildung 1: Korrelation zwischen Keimzahl und % Transmission [578 nm] bei Haemophilus influenzae BC 31, Streptococcus pneumoniae ATCC 6302 und Klebsiella pneumoniae WG 14

Für Versuche, bei denen Keimzahlen im Bereich von $10^8$-$10^9$ Bakterien/ml benötigt wurden, wurden folgende Transmissionseinstellungen und Verdünnungen für die Keime gewählt:

Tabelle 2: Korrelation zwischen Keimzahl und % Transmission [578 nm]

| Keim | % Transmission | Verdünnung | Keimzahl/ml |
|---|---|---|---|
| Klebsiella pneumoniae | 65 | 1:100 | $7,9 \times 10^8$ |
| Haemophilus influenzae | 90 | 1:10 | $7,5 \times 10^8$ |
| Streptococcus pneumoniae | 95 | 1:10 | $7,9 \times 10^8$ |

3. Adhäsionsintensität von Klebsiella pneumoniae an Lungenepithelzellen

Es wurde überprüft, ob unter den gewählten Versuchsbedingungen im Adhäsionsversuch die Bakterien eine feste Bindung zu den Epithelzellen eingegangen waren. Dazu wurde nach einem Adhäsionsversuch (II, 9.2) der Bakterienüberstand abpipettiert und der Monolayer zehnmal mit je 1 ml PBS gespült. Von jeder Spülung und vom Monolayer wurde jeweils die Radioaktivität gemessen. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, war ab der 3. Spülung die Radioaktivität auf einen konstanten Wert zurückgegangen. Mit zwei Spülungen waren demnach nicht fest haftende Bakterien entfernt worden, die verbleibenden Bakterien zeigten eine durch PBS irreversible Adhäsion an die Epithelzellen.

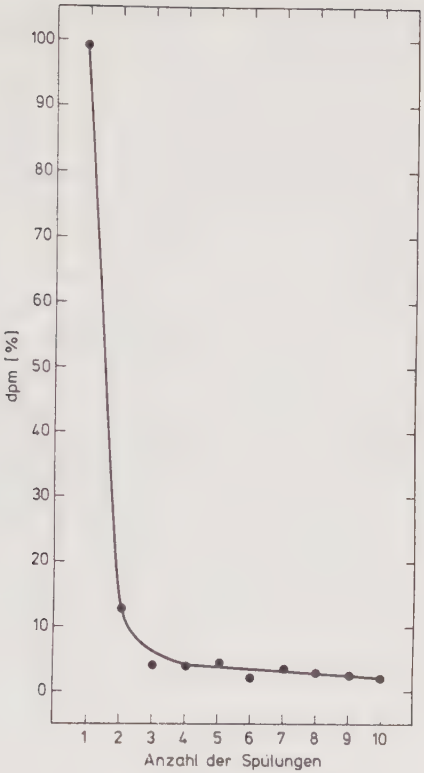



Abbildung 2: Radioaktivität von markierten, nicht adhärenten Klebsiella pneumoniae WG 14 in aufeinanderfolgenden Spülungen eines Monolayers von Lungenepithelzellen.

4. Bakterienkonzentration und Zeitkinetik der Adhäsion

Am Beispiel von Klebsiella pneumoniae WG 14 wurde ermittelt, über welchen Zeitraum der Adhäsionsverlauf verfolgt werden sollte und welche Bakterienkonzentration bei der gegebenen Zahl von $10^6$ Epithelzellen im Monolayer für eine Adhäsionskinetik benötigt wurde. Dazu wurden $10^5$, $10^7$ und $10^9$ Bakterien pro Monolayer eingesetzt, der Adhäsionsverlauf wurde über 4 Stunden verfolgt (II, 10.1). Dabei zeigte sich, daß mit $10^9$ Bakterien die Adhäsion nach 4 Stunden etwa zwanzig Mal so stark war wie mit $10^5$ und $10^7$ Bakterien und einer zeitabhängigen Kinetik folgte, während die niedrigen Bakterienkonzentrationen in einer gerade noch meßbaren, zeitunabhängigen Adhäsion verblieben. Bei $10^9$ Bakterien war die Adhäsionskinetik bei 4 Stunden bereits im Sättigungsbereich. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt. Von diesen Experimenten ausgehend wurden alle Adhäsionsversuche über 3 Stunden mit $10^9$ Bakterien pro Monolayer durchgeführt.

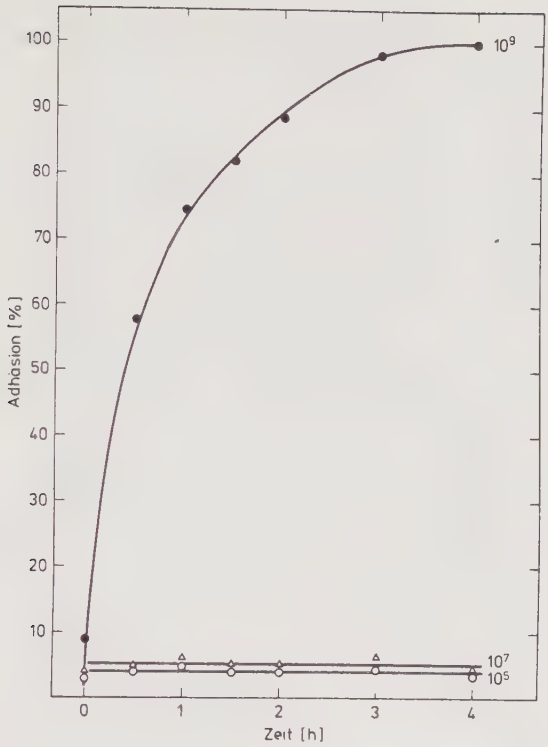



Abbildung 3: Adhäsion von $10^5$, $10^7$ und $10^9$ Cfu/ml Klebsiella pneumoniae WG 14 an $10^6$ Lungenepithelzellen über 4 Stunden

5. pH-Optimum der Adhäsion

Eine Beeinflussung der Adhäsion durch den pH-Wert im Testansatz wurde bei Klebsiella pneumoniae WG 14 im Bereich von pH 3,5 - 7,5 untersucht (II, 10.2). Ziel war es - vergleichbar mit den Bakterienkonzentrationsversuchen - eine möglichst starke Adhäsion zu erzielen, um bei späteren Hemmversuchen eine deutliche Differenz

zwischen Kontroll-Adhäsion und gehemmter Adhäsion zu sehen. Wie aus Abbildung 4 zu ersehen ist, war bei pH 5,5 ein Adhäsionsoptimum erreicht.

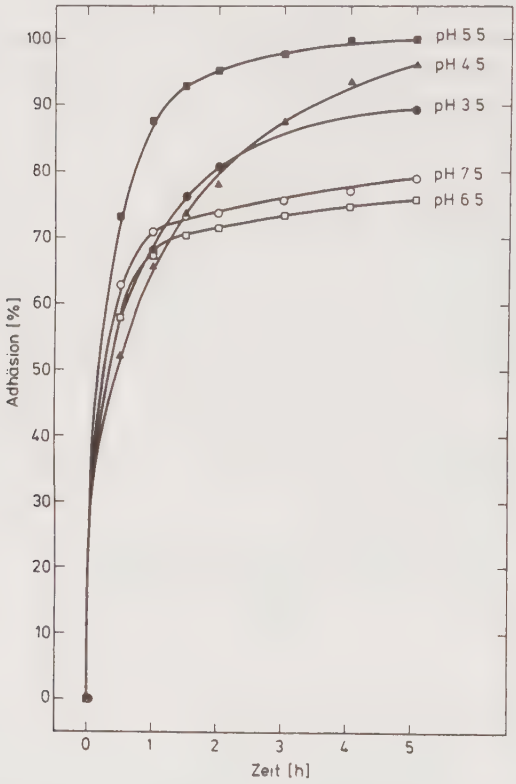



Abbildung 4: Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen in einem pH-Bereich von 3,5 - 7,5 über 5 Stunden

6. Pili-Indices von Klebsiella pneumoniae

Der Pili-Index setzt sich aus zwei Faktoren zusammen: Anzahl der Pili pro Bakterium und Prozentsatz der Pili-tragenden Bakterien in einer Population. Er wurde aufgestellt, um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen Pili-Index, Adhäsivität und Virulenz besteht. Zu diesem Zweck wurden 6 Klinikisolate und ein ATCC-Referenzstamm elektronenmikroskopisch untersucht (II, 1.1). Die Pili-Indices sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 3: Pili-Indices eines Referenzstammes und verschiedener Klinikisolate

| K.pneumoniae-Stamm | Pili/Bakterium | % Pilibakterien | Pili-Index |
|---|---|---|---|
| WG 14 | > 200 | > 95 % | > 19 000 |
| ATCC 10031 | 150 | 90 | 13 500 |
| WG 6 | 100 | 40 | 4 000 |
| BC 6 | 100 | 20 | 2 000 |
| WG 10 | 100 | 20 | 2 000 |
| WG 8 | 100 | 10 | 1 000 |
| BC 53a | 100 | 10 | 1 000 |

Abbildung 5: Elektromikroskopische Aufnahme von Klebsiella pneumoniae WG 14. Platin-Kohle bedampft. Vergrößerung 47 000fach

7. Adhäsivität bei 6 Klebsiella pneumoniae-Klinikisolaten und einem Referenzstamm

Die Adhäsivität der verschiedenen Klebsiella-Stämme wurde in Anzahl der Bakterien pro Epithelzelle gemessen (II, 12.) und auf eine Korrelation mit dem Pili-Index überprüft. Die Zahl der Bakterien pro Epithelzelle wurde rechnerisch - über die Radioaktivität einer bekannten Keimzahl der eingesetzten Bakterien - aus der Radioaktivität der adhärenten Bakterien und Zahl der Epithelzellen im Monolayer ermittelt. Dies ergab folgende Reihenfolge in der Adhäsivität:

Tabelle 4: Adhäsivität eines Referenzstammes und verschiedener Klinikisolate an Lungenepithelzellen nach 2,5 Stunden

| K. pneumoniae | Bakterien/Epithelzelle |
|---|---|
| WG 14 | 5,08 |
| ATCC 10031 | 2,54 |
| WG 6 | 1,40 |
| WG 8 | 0,63 |
| BC 53a | 0,45 |
| BC 6 | 0,41 |
| WG 10 | 0,25 |

Diese Ergebnisse sind als Zeitkinetik in Abbildung 6 dargestellt. Bei den Klebsiella-Stämmen WG 14, ATCC 10031 und WG 6, die ein relativ starkes, voneinander abgestuftes Adhäsionsvermögen zeigen, besteht somit eine Korrelation zwischen Pili-Index und Adhäsivität. Bei den vier anderen Stämmen, die eine untereinander ähnliche, schwache Adhäsivität zeigen, konnte eine solche Korrelation nur tendenziös im Vergleich zu den guten Adhäsionsstämmen gezeigt werden.

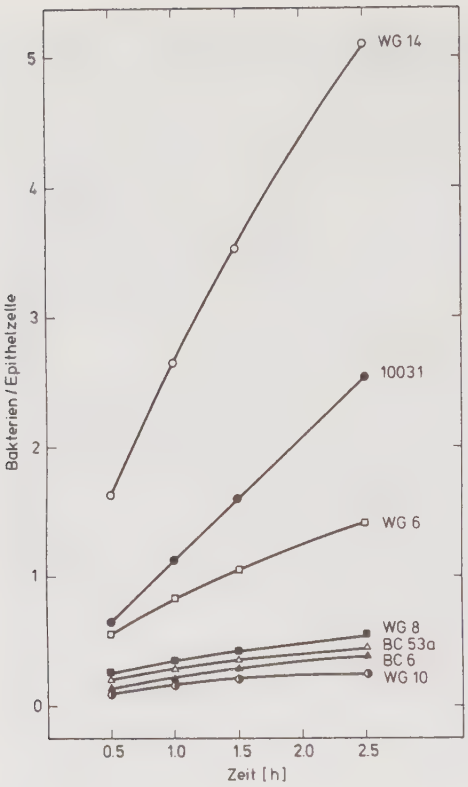



Abbildung 6: Adhäsivität eines Referenzstammes und verschiedener Klebsiella pneumoniae-Klinikisolate an Lungenepithelzellen nach 2,5 Stunden

8. In vivo-Virulenz von 2 Klebsiella pneumoniae-Klinikisolaten und einem Referenzstamm

Die Virulenz wurde in diesem Fall nach der Zahl der Bakterien beurteilt, die eine Stunde nach der standardisierten intranasalen Infektion im Lungenhomogenat nachgewiesen werden konnte (II, 13.).

Um eine größere Zahl von Tierversuchen zu vermeiden, wurden diese Korrelationsprüfungen auf 3 Klebsiella Pneumoniae-Stämme beschränkt - WG 14, ATCC 10031 und WG 6 -, bei denen sich bereits eine eindeutige Korrelation zwischen Pili-Index und Adhäsivität gezeigt hatte. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 5: Keimzahl eines Referenzstammes und zweier Klinikisolate im Lungenhomogenat eine Stunde nach der Infektion

| Stamm | Keimzahl/Lunge | | Keimzahl-änderung |
|---|---|---|---|
| | 0 Stunden | 1 Stunde | |
| WG 14 | $2{,}64 \times 10^6$ | $3{,}10 \times 10^6$ | + 17 % |
| ATCC 10031 | $2{,}32 \times 10^6$ | $1{,}94 \times 10^6$ | - 16 % |
| WG 6 | $2{,}47 \times 10^6$ | $1{,}90 \times 10^6$ | - 23 % |

Damit zeigte sich, daß die in vivo-Virulenz - bezüglich der angegangenen Keime nach einer Stunde - bei diesen 3 Stämmen mit dem Pili-Index und der in vitro-Adhäsivität korreliert. Der relativ kurze Zeitraum von einer Stunde wurde gewählt, um andere Virulenz-Faktoren, wie Invasivität, Toxinbildung, Ausscheidung von Proteasen und spezifische in vivo-Wachstumsraten, auszuschalten.

9. Adhäsion nach enzymatischem Abbau epithelialer Oberflächen-Proteine

Bei den Adhäsions-Rezeptoren auf der Epithelzelloberfläche handelt es sich, nach vielen Literaturhinweisen, vermutlich um Glycoproteine (Beachey, 1981, 1982; Elbein et al., 1981). Daher wurde versucht, mit verschiedenen Proteasen und zuckerspaltenden Enzymen diese Rezeptoren abzubauen, um damit die Adhäsion zu hemmen und so eine Relevanz und Charakteristik von Rezeptoren nachzuweisen.

Zu diesem Zweck wurde zuerst die tolerable Enzymkonzentration gesucht, die 18 Stunden vor der Inkubation mit Bakterien den Epithelzellen zugesetzt werden konnte, ohne die Zellen physiologisch zu schädigen oder abzutöten (II, 14.1). Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 6: Enzymkonzentrationen, die für die untersuchten Lungenepithelzellen in einem tolerablen Bereich liegen.

| Enzym | Konzentration [U/ml] | % überlebende Zellen |
|---|---|---|
| α-Glucosidase | 12,5 | 88 |
| ß-Glucosidase | 3500 | 96 |
| Hyaluronidase | 5000 | 100 |
| Neuraminidase | 0,1 | 85 |
| Kollagenase | 350 | 100 |
| Papain | 35000 | 100 |
| Pepsin | 10000 | 92 |
| Pronase | 1000 | 99 |
| Trypsin | 2000 | 91 |

Mit diesen Enzymkonzentrationen wurden die Epithelzellen über Nacht inkubiert und danach einem Adhäsionsversuch unterzogen (II, 14.2). Dabei zeigte sich, daß Neuraminidase und Papain eine konzentrationsabhängige Adhäsionshemmung aufwiesen. Die Adhäsionswerte einiger anderer Enzyme lagen über dem Kontrollwert ohne Enzym. Vermutlich sind die Zellen unter dem Einfluß dieser Enzyme schwach geschädigt oder so verändert worden, daß sie anfälliger für die Adhäsion waren (Ramirez-Ronda, 1978, a, b; Sugarman, 1980). Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 7: Enzymatischer Einfluß auf die Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen.

| Enzym | Konzentration [U/ml] | % Adhäsion |
|---|---|---|
| α-Glucosidase | 12,5 | 109 |
| | 9,3 | 104 |
| ß-Glucosidase | 5000 | 111 |
| | 3500 | 107 |
| | 2000 | 100 |
| Hyaluronidase | 20000 | 114 |
| | 5000 | 113 |
| | 1250 | 105 |
| Neuraminidase | 0,1 | 78 |
| | 0,025 | 95 |
| Kollagenase | 400 | 135 |
| | 350 | 127 |
| | 300 | 125 |
| Papain | 55000 | 68 |
| | 35000 | 84 |
| | 15000 | 86 |
| Pepsin | 15000 | 134 |
| | 10000 | 126 |
| | 5000 | 112 |
| Pronase | 1200 | 107 |
| | 1000 | 106 |
| | 800 | 100 |
| Trypsin | 3000 | 127 |
| | 2000 | 127 |
| | 1000 | 111 |

10. Einfluß isolierter Pili auf die bakterielle Adhäsion

Beim Abscheren der Pili (II, 15.1) von Bakterien wurden neben intakten Pili auch die verschiedensten Bruchstücke isoliert, die wahrscheinlich zumindest teilweise ihre Adhäsionseigenschaften verloren hatten.
Deshalb wurde zur weiteren Reinigung und Charakterisierung der Pili eine Sephadex G 75-Säule mit circa 9 ml Bettvolumen eingesetzt. Die Elution erfolgte mit 10 x 250 µl PBS pH 5,5. Jede dieser 10 Fraktionen wurde auf Protein- und Piligehalt untersucht (II, 15.1). Dabei zeigte sich wie in Abbildung 7 dargestellt, daß zwei Proteinpeaks mit Maxima in den Fraktionen 3/4 und 8/9 auftauchten.

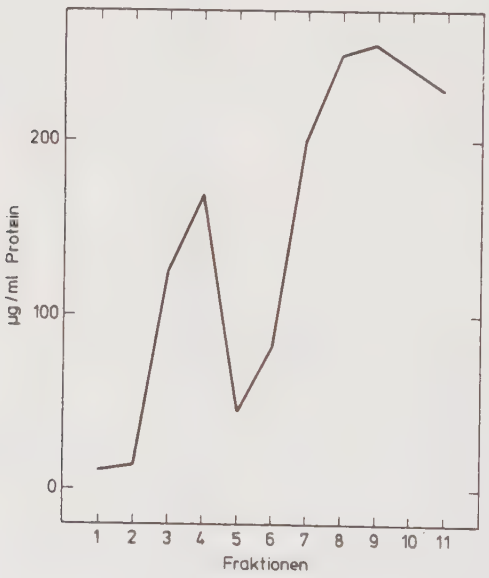



Abbildung 7: Proteingehalt in den Fraktionen einer Sephadex G 75-Säule bei der Reinigung von Pili von Klebsiella pneumoniae WG 1

Nach der elektronenmikroskopischen Untersuchung enthielten jedoch nur die Fraktionen 3 und 4 einheitliche Pili. Diese beiden Fraktionen wurden vereinigt und für einen Adhäsionsverusch mit dem Donorstamm und 5 anderen Klebsiella pneumoniae-Stämmen eingesetzt.

Die vorhandene Proteinmenge wurde so verdünnt, daß für jede Probe 14,7 µg Protein/ml zur Adhäsionshemmung eingesetzt wurden (II, 15.2). Der Donorstamm Klebsiella pneumoniae WG 14 wurde zu 15 % an der Adhäsion an Lungenepithelzellen gehemmt, Klebsiella pneumoniae WG 6 zu 8 %, alle anderen Stämme nicht. Wenngleich bei einer größeren Piliprotein-Menge und Reinheit höhere Hemmwerte zu erwarten gewesen wären und eventuell bei den anderen Stämmen ebenfalls eine Hemmung hätte beobachtet werden können, deutet dieses Ergebnis auf eine gewisse Spezifität in der Pili-Rezeptor-Bindung hin.

Alternativ wurden die Pili mittels präparativer Isoelektrofokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt (II, 15.1.2). Diese Methode hatte zwei Vorteile. Erstens konnte das gesamte Pili-haltige Zentrifugat, das nach dem Abscheren anfiel (II, 15.1) in einer einzigen Isoelektrofokussierung aufgetrennt werden und zweitens konnten die Pili-Bruchstücke, die einen anderen isoelektrischen Punkt wie die intakten Pili hatten, abgetrennt werden. Alle 30 Fraktionen wurden elektronenmikroskopisch untersucht und im Adhäsionsversuch mit dem Donor-Stamm getestet. Dabei zeigte sich, daß die Fraktion 3 mit dem isoelektrischen Punkt IEP = pH 3,8 die Adhäsion des Donor-Stammes Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen zu 60 % hemmte. Ebenfalls konnten in diesen Fraktionen elektronenmikroskopisch lange, d. h. vermutlich intakte Pili beobachtet werden, in den anderen Fraktionen dagegen keine oder nur kurze Bruchstücke. Diese Ergebnisse sind aus Abbildung 8 ersichtlich.

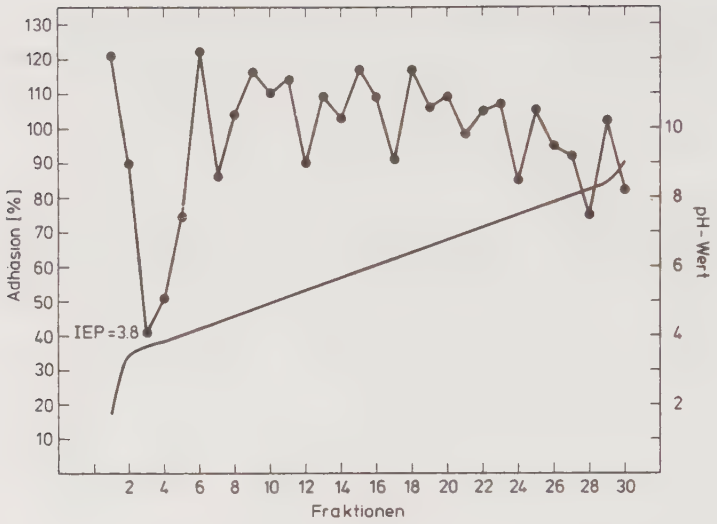



Abbildung 8: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen nach Vorinkubation der Zellen mit Pili-haltigen Fraktionen einer präparativen Isolelektrofokussierung. Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

Die analytische Isoelektrofokussierung wurde durchgeführt, um den isoelektrischen Punkt der intakten Pili, der in der präparativen Isoelektrofokussierung gefunden worden war, zu präzisieren (II, 15.1.3). Sie ergab einen isoelektrischen Punkt der Pili von Klebsiella Pneumoniae WG 14 von IEP = pH 4,0.

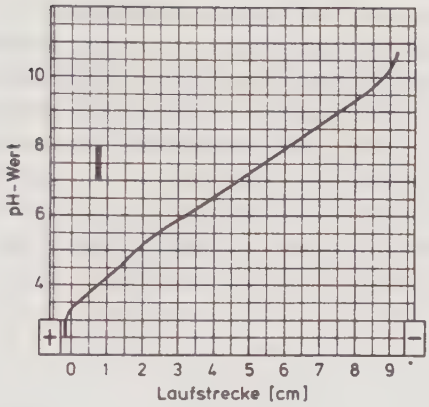
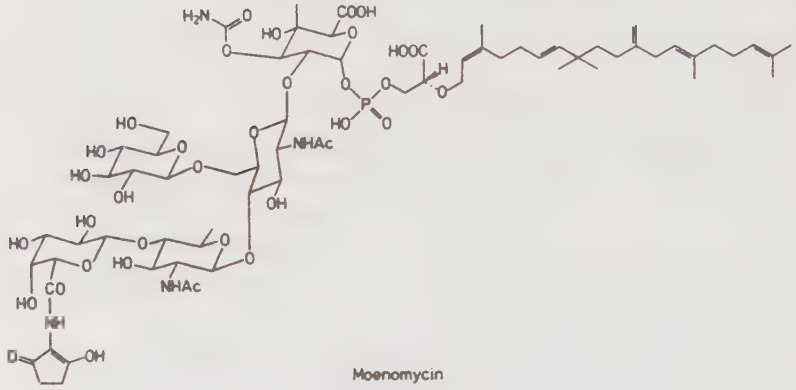



Abbildung 9: Isoelektrischer Punkt intakter Pili von Klebsiella pneumoniae WG 14 in einem vorgegebenen pH-Gradienten in einer analytischen Isoelektrofokussierung

11. Antiadhäsive Wirkung verschiedener Antibiotica

Mit diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob Antibiotica auf Grund einer Zuckerkomponente in ihrer Struktur als Rezeptoranaloga (Zähner, 1983), oder in subinhibitorischen Konzentrationen durch eine Beeinflussung der Bakterienultrastruktur, infolge der Hemmung der Murein- oder spezifischen Piliprotein-Synthese (Alkan and Beachey, 1979; Bammann et al., 1978; Beachey et al., 1981; Davis and Savage, 1976; Eisenstein et al., 1978 a,b, 1979, 1980, 1981; Gorini, 1974; Ofek et al., 1979; Sandberg et al., 1979; Svanborg-Eden et al., 1978; Tylewska et al., 1980; Vosbeck et al., 1979), antiadhäsiv wirken können.

Zu diesem Zweck wurde das Zucker-Antibioticum Nojirimycin (5-amino-5-desoxy-D-Glucose) verwendet und die Glycophospholipid-Antibiotica Moenomycin und Macarbomycin, da den Phospholipiden neben den Zuckern eventuell ebenfalls eine antiadhäsive Wirkung zukommt (Reifenrath, 1983). Die Strukturformeln von Nojirimycin und Moenomycin sind in Abbildung 10 dargestellt, die Struktur von Macarbomycin ist noch nicht endgültig aufgeklärt.



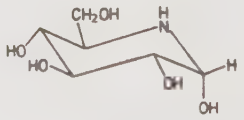




Abbildung 10: Strukturformeln von Moenomycin und Nojirimycin

Als Mureinsynthesehemmer wurden die ß-Lactame Cefotaxim und Moxalactam, als Proteinsynthese-Inhibitoren die Aminoglycoside Neomycin und Gentamycin, die Makrolide Erythromycin und Clindamycin sowie Tetracyclin und Chloramphenicol eingesetzt.

Es wurden Versuchsanordnungen gewählt, in denen die erstgenannten Antibiotica - Moenomycin, Macarbomycin und Nojirimycin - in demselben Konzentrationsbereich wie z. B. Zucker simultan mit den Bakterien zu den Epithelzellen in den Adhäsionsversuch gegeben wurden (II, 16.3.1). Mit den zuletzt genannten Antibiotica wurden dagegen die Bakterien in der 2. Passage in den Konzentrationen 1/2, 1/4 und 1/8 MHK 24 Stunden inkubiert. Vor dem Adhäsionsversuch wurden die Antibiotica entfernt (II, 16.3.2). Zuvor wurde ein möglicher antibakterieller Effekt und cytotoxischer Effekt von Moenomycin, Macarbomycin und Nojirimycin in einem Konzentrationsbereich von 0 - 100 µg/ml in PBS pH 5,5 über 3 Stunden untersucht (II, 16.1.1, 16.2). Es ergab sich unter diesen Versuchsbedingungen für Macarbomycin auch in niedrigen Konzentrationen eine so starke Cytotoxizität, daß es nicht in dem Zellkultur-Adhäsionsmodell eingesetzt werden konnte.

Nojirimycin und Moenomycin wiesen in den geprüften Konzentrationen weder eine cytotoxische Wirkung noch einen wesentlichen antibakteriellen Effekt auf, wie aus Abbildung 11 ersichtlich ist.

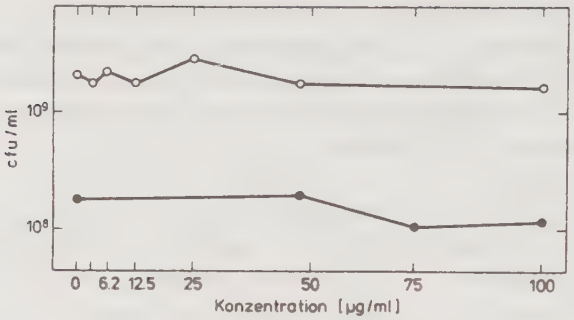



Abbildung 11: Cfu von Klebsiella pneumoniae WG 14 unter dem Einfluß einer Konzentrationsreihe von ○ Nojirimycin und ● Moenomycin

Im Adhäsionsversuch zeigte nur Nojirimycin in einer Konzentration von 100 µg/ml eine 20 %ige Adhäsionshemmung, dargestellt in Abbildung 12.

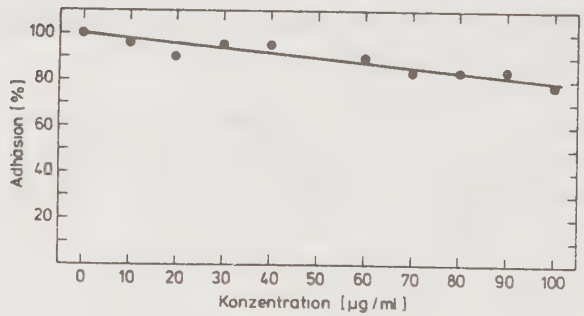



Abbildung 12: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe von Nojirimycin.
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

Die MHK-Bestimmung und die cfu-Bestimmung, die vor dem Adhäsionsversuch mit den Antibiotica der 2. Gruppe notwendig waren, (II, 16.1.2), erbrachten folgende Ergebnisse:

Tabelle 8: Minimale Hemmkonzentration (MHK) und Keimzahl bei subinhibitorischen Konzentrationen.

| Antibioticum | MHK [µg/ml] | Keimzahl/ml bei 1/2 MHK | Keimzahl/ml bei 1/4 MHK | Keimzahl/ml bei 1/8 MHK |
|---|---|---|---|---|
| Cefotaxim | 7,8 | $1,6 \times 10^2$ | $4,0 \times 10^2$ | $1,5 \times 10^4$ |
| Moxalactam | 62,5 | $0,6 \times 10^2$ | $2,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^8$ |
| Neomycin | 125,0 | $2,5 \times 10^2$ | $3,0 \times 10^7$ | $2,0 \times 10^9$ |
| Gentamycin | 31,2 | $5,0 \times 10^3$ | $5,0 \times 10^8$ | $6,0 \times 10^9$ |
| Erythromycin | 250,0 | $8,0 \times 10^2$ | $3,0 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^9$ |
| Clindamycin | 500,0 | $3,0 \times 10^3$ | $1,2 \times 10^4$ | $6,0 \times 10^9$ |
| Tetracyclin | 15,6 | $1,2 \times 10^3$ | $3,0 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^9$ |
| Chloramphenicol | 7,8 | $2,5 \times 10^2$ | $2,0 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^9$ |

Die Ergebnisse des Adhäsionsversuches, der nach der 24-stündigen Inkubation von Klebsiella pneumoniae WG 14 mit 1/2, 1/4 und 1/8 MHK durchgeführt worden war, sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 9: Minimale Hemmkonzentration (MHK) und Adhäsion bei subinhibitorischen Konzentrationen.

| Antibioticum | MHK [µg/ml] | % Adhäsion bei 1/2 MHK | % Adhäsion bei 1/4 MHK | % Adhäsion bei 1/8 MHK |
|---|---|---|---|---|
| Cefotaxim | 7,8 | 265 | 171 | 170 |
| Moxalactam | 62,5 | 278 | 226 | 126 |
| Neomycin | 125,0 | 154 | 125 | 78 |
| Gentamycin | 31,2 | 138 | 170 | 109 |
| Erythromycin | 250,0 | 203 | 159 | 167 |
| Clindamycin | 500,0 | 222 | 228 | 146 |
| Tetracyclin | 15,6 | 169 | 133 | 163 |
| Chloramphenicol | 7,8 | 100 | 105 | 115 |

Da nur die Keimzahl nach Inkubation mit 1/8 MHK noch der Keimzahl der Kontrolle entsprochen hatte, waren auch beim Adhäsionsversuch nur diese Werte relevant. Dabei zeigte sich, daß eine Neomycin-Vorinkubation von Klebsiella pneumoniae WG 14 mit 1/8 MHK (= 15,625 µg/ml) eine Adhäsionshemmung im Vergleich zur Kontrolle ohne Antibiotikum bewirkte (22 %).
Die Tatsache, daß bei allen anderen Antibiotika und Konzentrationen die Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle eher gesteigert war, könnte vielleicht damit erklärt werden, daß die hochdosierten Antibiotika beim Waschen der Bakterien nicht vollständig entfernt worden waren und einen cytotoxischen Effekt der Epithelzellen hervorriefen.

12. Antiadhäsive Wirkung verschiedener Zucker

Zucker sind als Bestandteil der epithelialen Glycoproteinrezeptoren ein wesentlicher Faktor der bakteriellen Adhäsion (Aronson et al., 1979; Beachey, 1981, 1982; Duguid and Old, 1980; Gibbons and Qureshi, 1979). Es wäre daher prinzipiell denkbar, mit Zuckern als Rezeptoranaloga die Adhäsionsstrukturen der Bakterien abzusättigen und dadurch die Adhäsion zu hemmen. Voraussetzung dafür sind jedoch nicht metabolisierbare, untoxische Zucker. Da die Zucker in den Glycoproteinen spezies- oder stammspezifisch von den Mikroorganismen erkannt werden - wobei nur eine begrenzte Zucker-Variation in den Rezeptorglycoproteinen vorkommt - könnte mit einer Kombination aus verschiedenen Disacchariden zumindest ein Teil des in Frage kommenden Spektrums abgedeckt werden. Aus diesem Grund wurden Derivate von häufig im Stoffwechsel vorkommenden Zuckern und ungewöhnliche Mono- und Oligosaccharide getestet:

| Monosaccharide | Oligosaccharide |
|---|---|
| Methyl-α-D-Glucose | Gentibiose |
| Phenyl-ß-D-Glucose | Trehalose |
| 2-Fluor-2-Desoxy-Glucose | Turanose |
| Methyl-α-D-Mannose | Melibiose |
| Mannan | Melezitose |
| N-Acetyl-D-Mannosamin | Stachyose |
| Methyl-α-D-Xylose | |
| myo Inositol | |
| D-Arabinopyranose | |

Obwohl die Toxizität dieser Zucker nicht im intakten Organismus überprüft wurde, erbrachte der Cytotoxizitätstest und der Test auf antimikrobielle Wirkung keinen negativen Einfluß (II, 17.1, 17.2). Im Adhäsionsversuch zeigten dagegen Methyl-α-D-Xylose und Methyl-α-D-Glucose eine konzentrationsabhängige antiadhäsive Wirkung. Dabei wurde, wie in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt, eine 50 %ige Adhäsionshemmung mit 50 µg/ml Zucker erreicht.

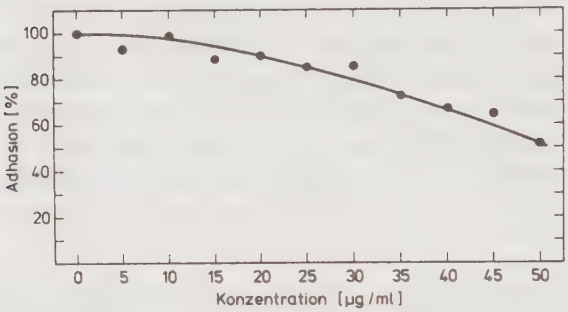



Abbildung 13: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe von Metyhl-α-D-Xylose.
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

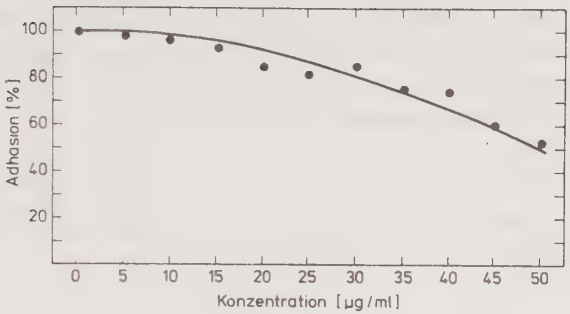
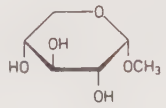


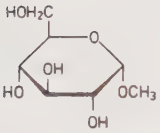

Abbildung 14: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe von Methyl-α-D-Glucose.
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

Vergleicht man die Stukturformeln der beiden antiadhäsiv wirkenden Zucker - Methylxylose und Methylglucose -, so stellt man fest, daß die methylierte Xylose im Vergleich zur methylierten Glucose am $C_5$ keine $CH_2OH$-Gruppe besitzt. Folglich handelt es sich dabei wahrscheinlich nicht um eine für die antiadhäsive Wirkung essentielle funktionelle Gruppe. Der Grund dafür, daß die Phenyl-ß-D-Glucose im Gegensatz zur Methyl-α-D-Glucose nicht antiadhäsiv wirkt, könnte darin liegen, daß die Phenyl-Gruppe ß-orientiert ist oder eine sterische Behinderung darstellt. Die methylierte Mannose unterscheidet sich von der Methyl-Glucose nur in der Stellung der OH-Gruppe am $C_2$, also nimmt diese vermutlich eine dominante Funktion im Adhäsionsvorgang wahr. Dies gilt ebenso für die anderen Mannose-Derivate und für Arabinose. Die mangelnde Wirkung von Inositol geht eventuell auf die fehlende Methyl-Gruppe oder das feh-

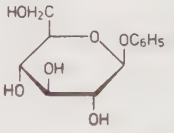
lende Sauerstoff-Atom im Ringsystem zurück. Von den Di- und Oligosacchariden wirkte keine Verbindung antiadhäsiv. Dies könnte damit erklärt werden, daß die verknüpften Zucker aus sterischen Gründen nicht an den bakteriellen Liganden binden.



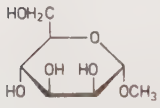

Methyl α-D-Xylopyranosid



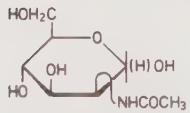

Methyl α-D-Glucopyranosid



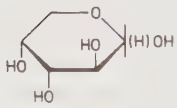

Phenyl β-D-Glucopyranosid



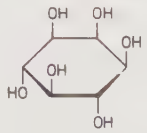

Methyl α-D-Mannopyranosid




N-Acetyl-D-mannosamin

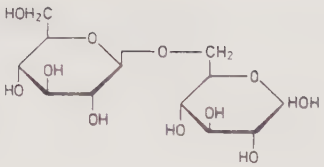



D-Arabinose

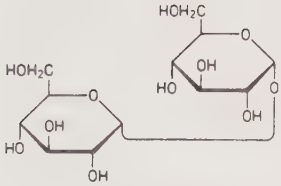



Myo-Inositol

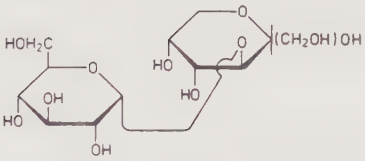
Abbildung 15: Strukturformeln der für den Adhäsionsversuch eingesetzten Monosaccharide



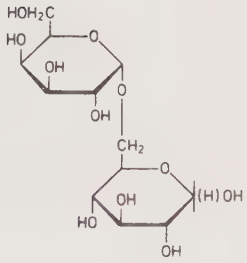
Gentiobiose
(6-O-β-D-glucopyranosyl-
D-glucopyranose)



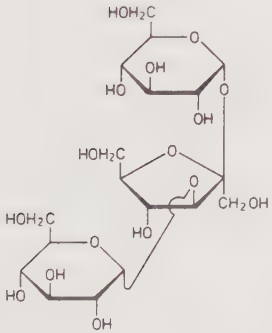
α, α-Trehalose
(1-O-α-D-glucopyranosyl-
α-D-glucopyranosid)



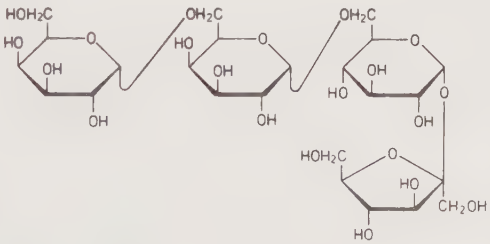
Turanose
(3-O-α-D-Glucopyranosyl-D-fructose)



Melibiose
(D-O-α-D-Galactopyranosyl-
D-glucofuranose)



Melezitose
(O-α-D-glucopyranosyl-(1→2)-
O-β-D-fructofuranosyl-(3→1)
α-D-glucopyranosid)



Stachyose

Abbildung 16: Strukturformeln der für den Adhäsionsversuch eingesetzten Di- und Oligosaccharide

13. Antiadhäsive Wirkung von Thrombozytenaggregationshemmern

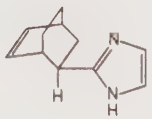
Der grundlegende Gedanke für diese Versuche war, daß Substanzen, die die Aggregation von Thrombozyten hemmen, ebenfalls potentielle Inhibitoren für die Adhäsion von Bakterien an Epithelzellen sein könnten. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden von der Pharmasynthese Gruppe F (Dr. Nickl) der Dr. Karl Thomae GmbH sechs Entwicklungssubstanzen mit verschiedenen Wirkungsmechanismen zur Verfügung gestellt.

a. Prostaglandin $I_2$-Aktivatoren
   AH-P 827
   SH 1223

b. Phosphodiesterase-Inhibitoren
   AH-P 719
   SH 1242

c. Adenosinaufnahme-Inhibitoren
   RE 102
   RE 244

AH-P 827




SH 1223

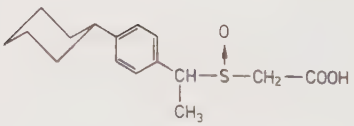
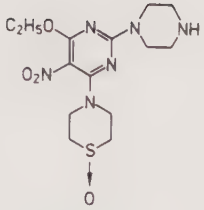



Abbildung 17: Strukturformeln der für den Adhäsionsversuch eingesetzten Prostaglandin $I_2$-Aktivatoren

AH-P719



SH 1242

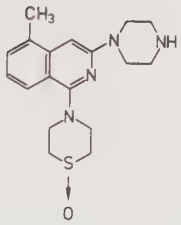
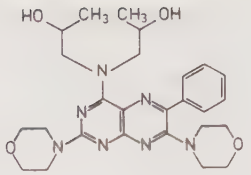


Abbildung 18: Strukturformeln der für den Adhäsionsversuch eingesetzten Phosphodiesterase-Inhibitoren

RE 102



RE 244

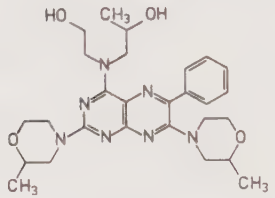


Abbildung 19: Strukturformeln der für den Adhäsionsversuch eingesetzten Adenosinaufnahme-Inhibitoren

Im Zellkulturmodell zeigten alle sechs Substanzen keinen toxischen Effekt (II, 18.2). Auch ein Einfluß auf das Bakterienwachstum war unter den gewählten Versuchsbedingungen (II, 18.1) nicht zu beobachten. Deutlich antiadhäsiv wirkten die beiden Phosphodiesterase-Inhibitoren und einer der Prostaglandin-Aktivatoren. Dabei wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml 30 % Hemmung mit SH 1242, 55 % Hemmung mit AH-P 719 und 45 % Hemmung mit AH-P 827 erreicht. Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 20, 21, 22 dargestellt. Die übrigen Substanzen waren in diesem Adhäsionsmodell unwirksam.

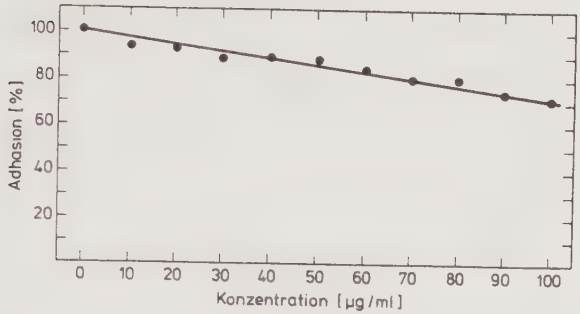



Abbildung 20: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe des Phosphodiesterase-Inhibitors SH 1242. Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

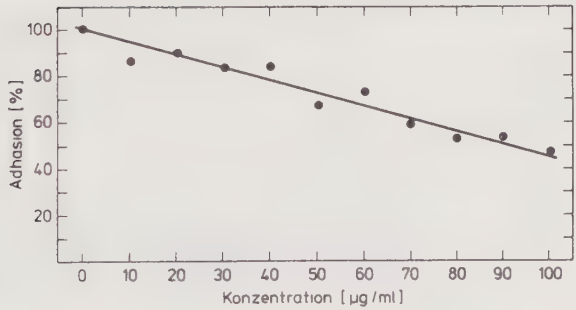



Abbildung 21: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe des Phosphodiesterase-Inhibitors AH-P 719. Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

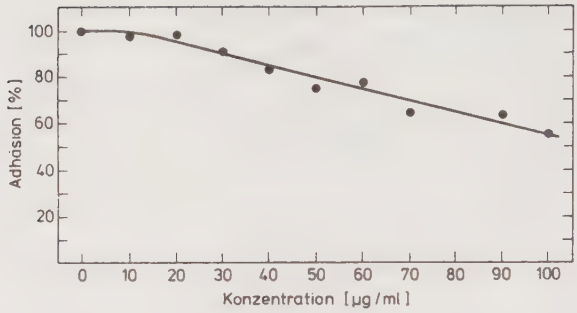



Abbildung 22: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe des Prostaglandin $I_2$-Aktivators AH-P 827. Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

14. Antiadhäsive Wirkung von Benzylaminen

Obwohl zwei Vertreter der untersuchten Benzylamine bereits als Sekretolytica in der Therapie von Atemwegsinfektionen eingesetzt werden, häuften sich erst in jüngster Zeit Hinweise, daß es sich bei diesen Verbindungen um Antiadhäsiva handeln könnte:

- infizierte Wunden heilten komplikationsloser nach äußerlicher Anwendung von Benzylaminlösung (Pido et al., 1976; Siasco and Palillo, 1979),
- Rinder-Mastitis klang schneller ab unter massiver Keimausschwemmung mit der Milch (Ziv, 1983),
- die bakterielle Clearance bei Atemwegsinfektionen wurde verbessert, obwohl die Cilienmotorik unbeeinflußt blieb (Krüger, 1983).

Für keinen Erreger dieser Infektionen konnte eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung der Benzylamine unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden, mit der diese Effekte hätten erklärt werden können. Aus diesem Grund wurde die antiadhäsive Wirkung einiger Benzylamine im in vitro-Modell überprüft (II, 19.3), nachdem weder ein cytotoxischer Effekt noch eine Beeinflussung des Wachstums von Klebsiella pneumoniae festgestellt werden konnte (II, 19.1, 19.2).
Dabei wiesen folgende Substanzen eine konzentrationsabhängige Adhäsionshemmung von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen auf:

Tabelle 10: Antiadhäsive Wirkung von Benzylaminen

| Substanz | % Adhäsionshemmung mit 100 µg/ml |
|---|---|
| AX-AB 950 | 15 |
| NA 274 | 20 |
| NA 872 | 25 |
| NA 611 | 25 |
| NA 732 | 30 |
| NX-AB 2180 | 35 |

Die Kinetiken der Adhäsionshemmung sind in den Abbildungen 23-28 dargestellt.

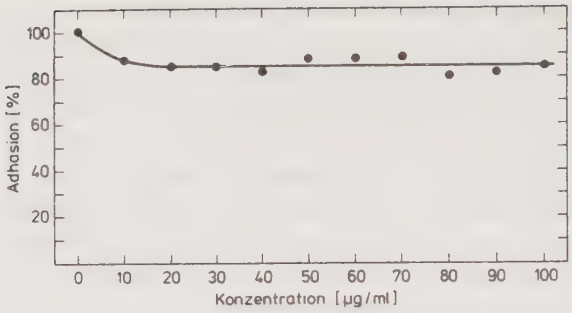



Abbildung 23: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe des Benzylamins AX-AB 950.
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

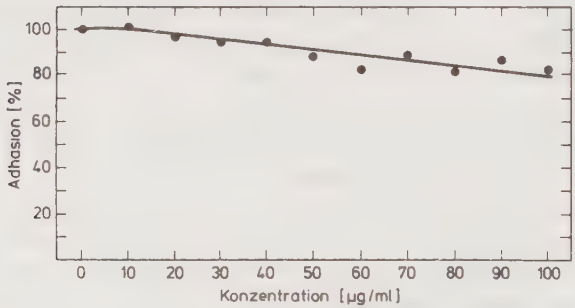



Abbildung 24: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe des Benzylamins NA 274 (Bromhexin)
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

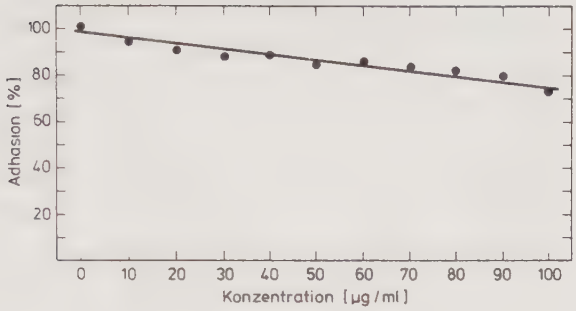



Abbildung 25: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe des Benzylamins NA 872 (Ambroxol).
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

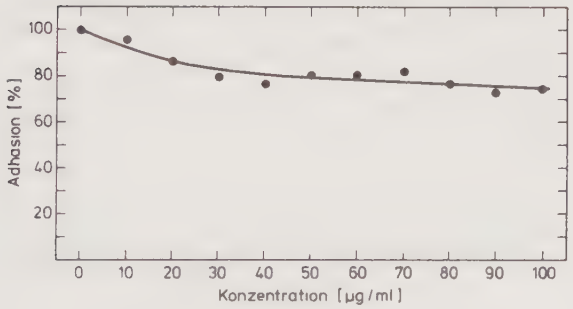



Abbildung 26: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe des Benzylamins NA 611.
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

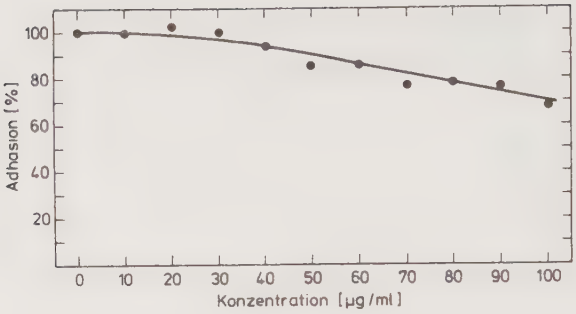



Abbildung 27: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe des Benzylamins NA 732.
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

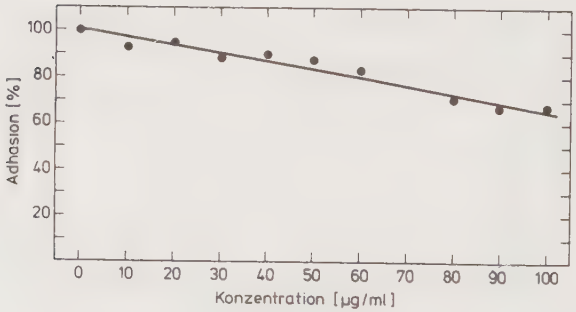
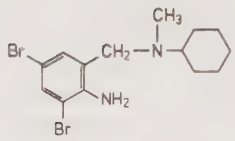


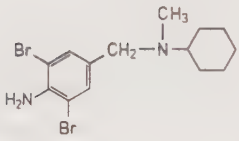

Abbildung 28: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe des Benzylamins NX-AB 2180.
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

Zur Struktur-Wirkungsbeziehung in diesem Modell kann man feststellen, daß sowohl die Positionsveränderung der Aminogruppe am aromatischen System - zumindest in der Bromhexin-Reihe - bzw. deren Ersatz durch eine Hydroxy-Gruppe wie auch die Substitution eines Broms im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen NA 274 (Bromhexin) und NA 872 (Ambroxol) zur Unwirksamkeit führen. Dies trifft für NA 300, NA 1010, NA 1018, NA 1352, NA 1523 und AB-A 712 zu. Ein heterozyklischer Ring am N-terminalen Ende wie bei AX-AB 950 wirkt schlechter als ein reiner Kohlenstoff-Ring, aliphatische Seitenketten wie bei NA 611 und NA 732 dagegen besser, wobei die Kettenlänge eventuell eine Rolle spielen könnte. Die beste Wirkung in diesem in vitro-Modell zeigte ein Ambroxol-Derivat, dessen 6-Ring am N-terminalen Ende durch einen Ring aus 3 C-Atomen ersetzt war. Die Strukturformeln der Benzylamine sind in den Abbildungen 29-31 dargestellt.

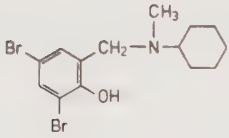
NA 274




NA 300




NA 1010




NA 1018

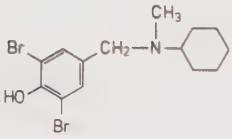
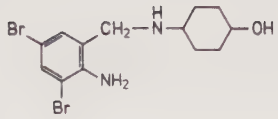
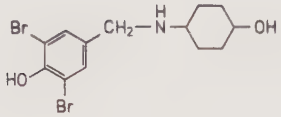



Abbildung 29: Strukturformeln verschiedener Benzylamine vom Bromhexin-Typ

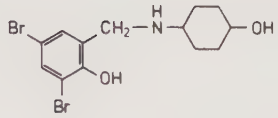
NA 872




NA 1352




NA 1523




AB-A 712

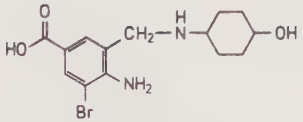
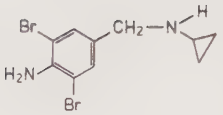
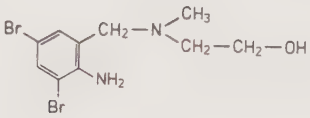



Abbildung 30: Strukturformeln verschiedener Benzylamine vom Ambroxol-Typ

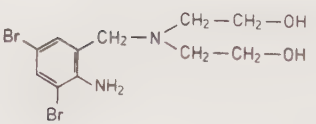
NX-AB 2180




NA 732




NA 611




AX-AB 950

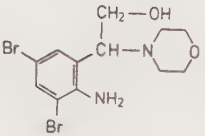



Abbildung 31: Strukturformeln verschiedener Benzylamine mit Substitution des 6-Ringes am N-Terminus

Von der Überlegung ausgehend, daß die Adhäsion bzw. deren Hemmung im Organismus ein komplexerer Vorgang als im Zellkultur-Adhäsionsmodell ist und daß die Wirkung der Benzylamine auch auf sekundären Effekten beruhen könnte, wurden Versuche mit Lungenwaschwasser aus mit Benzylaminen behandelten und nicht behandelten Tieren durchgeführt. Die Idee war, daß unter Behandlung Lungenzellen sowie deren Sekret Veränderungen unterworfen werden, die sich nur im lebenden Organismus abspielen können. Dieses Sekret, das nach der Gewinnung durch Lungen-Spülung mit 0,3 M Harnstoff-Lösung mittels präparativer Isoelektrofokussierung in 30 Protein-haltige Fraktionen aufgetrennt worden war, wurde im in vitro-Adhäsionsmodell mit Lungenepithelzellen und Klebsiella pneumoniae WG 14 auf seine adhäsiven Eigenschaften überprüft (II, 19.4.1, 19.4.2, 19.4.3). Dabei zeigte sich, daß unter den 30 Fraktionen mindestens 7 Fraktionen mit reproduzierbaren isoelektrischen Punkten waren, durch die die Adhäsion im Vergleich zur Harnstoff-Kontrolle gesteigert wurde, die demnach als Adhäsionsmediatoren fungierten. Unter Behandlung wurde diese Steigerung zum Teil wieder reduziert, d. h. die Adhäsionsmediatoren wurden durch die Benzylamine gehemmt. Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 32 und 33 dargestellt.

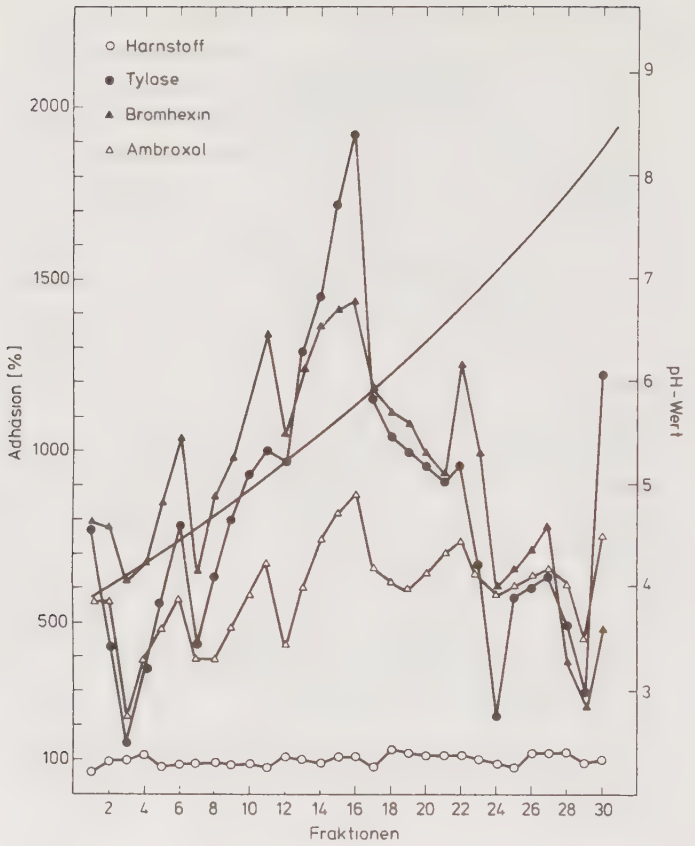



Abbildung 32: Adhäsion von $10^9$ Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen nach Vorinkubation der Bakterien mit Fraktionen einer präparativen Isoelektrofokussierung von hämolytischem Lungenwaschwasser. Harnstoff-Kontrolle = 100 % Adhäsion.
○ Harnstoff-Kontrolle, ● Tylose(= Placebo)-behandelte Tiere, ▲ Bromhexin-behandelte Tiere, △ Ambroxol-behandelte Tiere

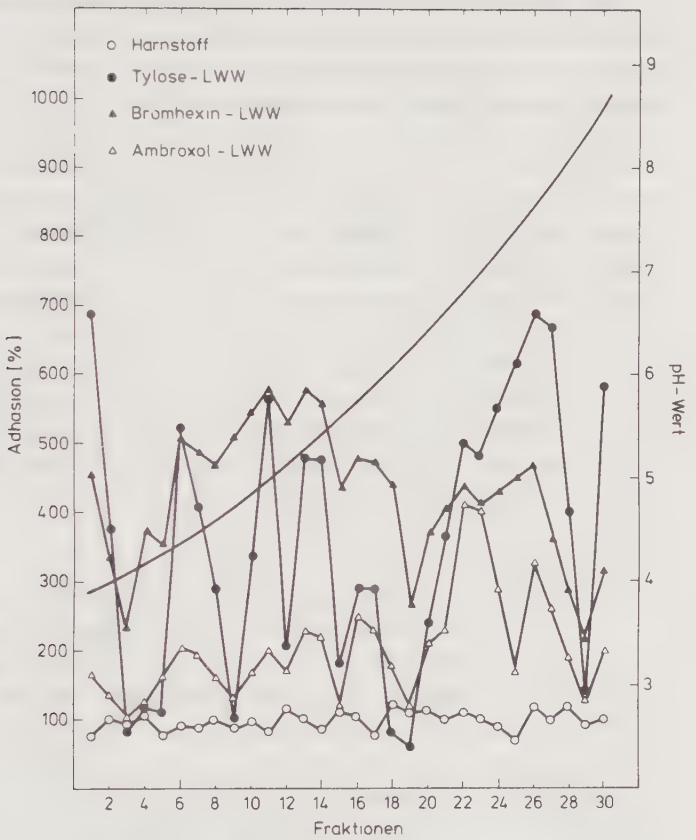



Abbildung 33: Adhäsion von $5x10^8$ Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen nach Vorinkubation der Bakterien mit Fraktionen einer präparativen Isoelektrofokussierung von nicht-hämolytischem Lungenwaschwasser.
Harnstoff-Kontrolle = 100 % Adhäsion.
○ Harnstoff-Kontrolle, ● Tylose (= Placebo)-behandelte Tiere, ▲ Bromhexin-behandelte Tiere, △ Ambroxol-behandelte Tiere

In der ersten Versuchsreihe waren alle Lungenwasch-wasser-Proben stark hämolytisch. Bei der zweiten Versuchsserie wurden nur nicht-hämolytische Proben verwendet. Außerdem wurde der Bakterientiter im Adhäsionsversuch von $10^9$ auf $5 \times 10^8$ reduziert, um das in vitro-System sensibler für Veränderungen zu machen. Damit lassen sich Unterschiede bei den beiden Ergebnissen erklären. Der stark ausgeprägte adhäsionssteigernde Peak beim isoelektrischen Punkt IEP = pH 5,9 im hämolytischen Lungenwaschwasser war im nicht-hämolytischen deutlich geringer. Gemäß der niedrigeren Keimzahl im Adhäsionsversuch der zweiten Serie war die Adhäsion wie zu erwarten insgesamt schwächer, aber der Unterschied zwischen Lungenwaschwasserproben aus behandelten und unbehandelten Tieren ausgeprägter. In beiden Versuchsreihen war Ambroxol deutlich wirksamer als Bromhexin.

Tabelle 11: Hemmung von 7 Adhäsionsmediatoren im Lungenwaschwasser durch Bromhexin und Ambroxol. Mit hämolytischem Lungenwaschwasser und einem Bakterientiter von $10^9$.

| Mediator Peak-IEP | % Adhäsionshemmung Bromhexin | Ambroxol |
|---|---|---|
| 3,9 | 0 | 27 |
| 4,4 | 0 | 28 |
| 4,9 | 0 | 33 |
| 5,9 | 25 | 55 |
| 6,7 | 0 | 23 |
| 7,6 | 0 | 0 |
| 8,6 | 61 | 38 |

Tabelle 12: Hemmung von 8 Adhäsionsmediatoren im Lungenwaschwasser durch Bromhexin und Ambroxol. Mit nicht-hämolytischem Lungenwaschwasser und einem Bakterientiter von $5 \times 10^8$.

| Mediator Peak-IEP | % Adhäsionshemmung Bromhexin | Ambroxol |
|---|---|---|
| 3,9 | 34 | 76 |
| 4,4 | 1 | 61 |
| 4,9 | 0 | 64 |
| 5,2 | 0 | 51 |
| 5,9 | 0 | 14 |
| 6,7 | 22 | 28 |
| 7,6 | 32 | 52 |
| 8,6 | 46 | 66 |

Zur näheren Charakterisierung der adhäsionsvermittelnden Proteine im Lungensekret bezüglich des Molekulargewichtes wurde jede Lungenwaschwasser-Fraktion aus der präparativen Isoelektrofokussierung, die eine Adhäsionssteigerung im in vitro-Adhäsionsmodell mit Lungenepithelzellen und Klebsiella pneumoniae WG 14 bewirkt hatte, einer Vertikalelektrophorese unterzogen und in 10 Unterfraktionen aufgetrennt. Diese Unterfraktionen wurden erneut auf ihre adhäsiven Eigenschaften im in vitro-Adhäsionsmodell geprüft (II, 19.4.4, 19.4.5). Von der Fraktion mit dem isoelektrischen Punkt IEP = pH 5,9 wurden auch die benachbarten Fraktionen auf die Vertikalelektrophorese gegeben. Die Ergebnisse sind aus Abbildung 34 zu ersehen. Dabei zeigten folgende Unterfraktionen wieder eine adhäsionssteigernde Wirkung:

Tabelle 13: Isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht von Adhäsionsmediatoren. Kontrolle = 100 %

| IEP der Fraktion | MG der Unterfraktion | % Adhäsion |
|---|---|---|
| 4,9 | 165 000 | 380 |
| 5,2 | 85 000 | 275 |
| 5,6 | 70 000 | 320 |
| 5,9 | 70 000 | 230 |
| 6,1 | 70 000 | 350 |
| 6,7 | 165 000 | 220 |

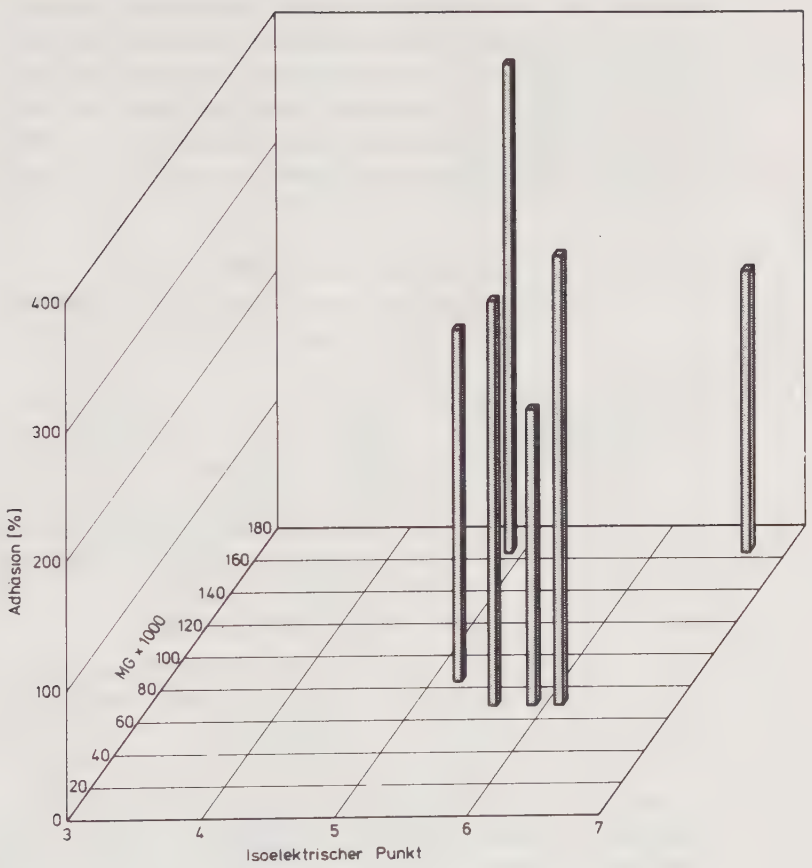



Abbildung 34: Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen nach Vorinkubation der Bakterien mit adhäsionssteigernden Lungenwaschwasser-Fraktionen aus einer präparativen Isoelektrofokussierung, aufgetrennt nach ihrem Molekulargewicht mittels Gelelektrophorese. Harnstoff-Kontrolle = 100 % Adhäsion

Parallel zu diesen Untersuchungen wurden mit jeder adhäsionssteigernden Lungenwaschwasser-Fraktion aus der präparativen Isoelektrofokussierung mittels käuflichen Test-Kids Enzymnachweis-Reaktionen für lungensekret-relevante Enyzme durchgeführt (II., 19.4.6). Dabei deckten sich in folgenden Fraktionen Enzymaktivitäten und adhäsionssteigernde Eigenschaften:

Tabelle 14: Enzyme in verschiedenen Lungenwaschwasserfraktionen aus einer präparativen Isoelektrofokussierung

| IEP der Fraktion | Enzym |
|---|---|
| 4,4 | Saure Phosphatase |
| 5,9 | Glutamat-Pyruvat-Transaminase |
| | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase |
| | α-Amylase |
| 6,7 | Saure Phosphatase |
| | Lactatdehydrogenase |
| | γ-Glutamyltransferase |

In der Fraktion aus der präparativen Isoelektrofokussierung mit dem isoelektrischen Punkt IEP = pH 5,9 war die Lokalisation des adhäsionsvermittelnden Proteins in der Unterfraktion mit dem Molekulargewicht 70 000 nachgewiesen worden und ferner waren in dieser Fraktion insgesamt drei Enzymaktivitäten gemessen worden.

Deshalb wurde im nächsten Schritt überprüft, ob

- eines der drei Enzyme auch in der adhäsionssteigernden Unterfraktion mit dem Molekulargewicht 70 000 nachgewiesen werden konnte,
- eines dieser Enzyme, die für diesen Zweck als Reinsubstanzen gekauft worden waren, im in vitro-Adhäsionsmodell mit Lungenepithelzellen und Klebsiella pneumoniae WG 14 ebenfalls eine adhäsionssteigernde Wirkung zeigte.

Dabei stellte sich heraus, daß nur α-Amylase in der adhäsionssteigernden Unterfraktion nachgewiesen werden konnte. Außerdem steigerte die gekaufte α-Amylase konzentrationsabhängig die Adhäsion, was in Abbildung 35 im Vergleich mit einigen anderen im Lungensekret vorkommenden Proteinen dargestellt ist.

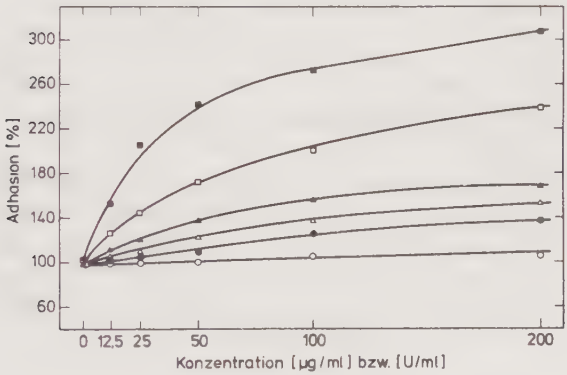



Abbildung 35: Steigerung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe von α-Amylase im Vergleich mit anderen im Lungensekret vorkommenden Proteinen.
■ CRP, □ Amylase, ▲ IgM, △ Transferrin,
● IgG, ○ Albumin.
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

Wie aus den Versuchen mit Lungenwaschwasser aus behandelten und nicht behandelten Tieren nachgewiesen werden konnte, wurde die adhäsionssteigernde Wirkung der Mediatorproteine unter Behandlung mit Bromhexin und Ambroxol reduziert. Deshalb wurde untersucht, ob auch die konzentrationsabhängige Adhäsionssteigerung durch α-Amy-

lase in vitro durch die Benzylamine gesenkt wird. Zu diesem Zweck wurde die α-Amylase in einer Konzentrationsreihe eingesetzt, während die Konzentration von Bromhexin, Ambroxol und eines gekauften Amylase-Inhibitors konstant gehalten wurde (50 µg/ml). Die Ergebnisse sind aus Abbildung 36 zu ersehen.

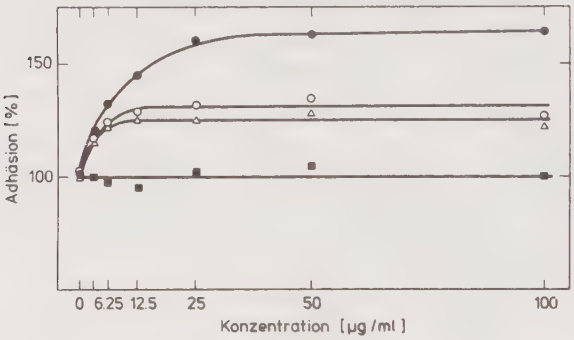



Abbildung 36: Reduktion der Amylase-bedingten, konzentrationsabhängigen Adhäsionssteigerung von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch ● PBS, △ Bromhexin, ○ Ambroxol, ■ Amylase-Inhibitor. Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

Die adhäsionssteigernde Wirkung von 50 µg/ml α-Amylase wurde durch die 3 Substanzen (50 µg/ml) mit folgenden Werten reduziert:

Tabelle 15: Hemmung der Adhäsionsmediator-Wirkung von 50 µg/ml α-Amylase durch 50 µg/ml eines Amylase-Inhibitors und zweier Benzylamine

| Enzym + Inhibitor | % Hemmung der Mediatorwirkung |
|---|---|
| α-Amylase + PBS (Kontrolle) | 0 |
| α-Amylase + Ambroxol | 52 |
| α-Amylase + Bromhexin | 61 |
| α-Amylase + Amylase-Inhibitor | 100 |

Im Zusammenhang damit wurde überprüft, ob sich die Hemmwirkung von Bromhexin, Ambroxol und des Amylase-Inhibitors ausschließlich auf die Adhäsionsmediatoreigenschaft erstreckt oder auch auf die enzymatische Aktivität. Dazu wurden durch photometrische Bestimmung der Spaltung von Amylopektin Azur (II, 19.4.7) die Inhibitor-Konzentrationen bestimmt, die zur 50 %igen Hemmung der Reaktion nötig sind ($IC_{50}$). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Danach beeinflußten Bromhexin und Ambroxol die katalytische Aktivität des Enzyms lediglich in weit höheren Konzentrationen als sie für die Adhäsionsmediator-Hemmung benötigt werden. Der Amylase-Inhibitor wirkt dagegen auch in niedrigeren Konzentrationen enzyminhibierend.

Tabelle 16: $IC_{50}$-Werte von Bromhexin, Ambroxol und einem Amylase-Inhibitor für die Spaltung von Amylopektin Azur durch α-Amylase

| Substanz | $IC_{50}$ [µg/ml] |
|---|---|
| Bromhexin | 2700 |
| Ambroxol | 2900 |
| Amylase-Inhibitor | 100 |

Im in vitro-Adhäsionsmodell mit Lungenepithelzellen und Klebsiella pneumoniae WG 14 hatte α-Amylase eine konzentrationsabhängige Adhäsionssteigerung gezeigt. Um nun zu untersuchen, ob dies auch für andere Erreger Gültigkeit besitzt, wurden unter denselben Versuchsbedingungen auch Haemophilus influenzae BC 31 und Streptococcus pneumoniae ATCC 6302 getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Danach steigert α-Amylase die Adhäsion aller drei Erreger, Haemophilus influenzae wird dabei am schwächsten beeinflußt.

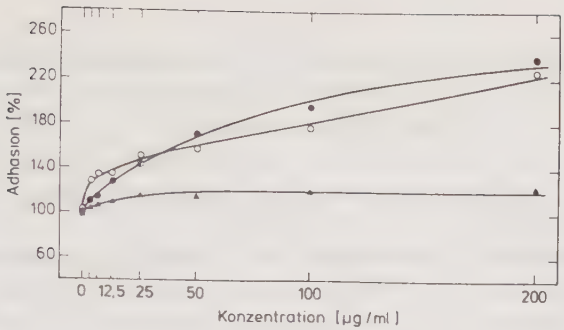



Abbildung 37: Steigerung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14, Haemophilus influenzae BC 31 und Streptococcus pneumoniae ATCC 6302 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe von α-Amylase.
● K. pneumoniae, ▲ H. influenzae, ○ Sc. pneumoniae

Als weitere Untersuchung zur Sekundärwirkung der Benzylamine wurde der Einfluß von Bromhexin und Ambroxol auf den Phospholipidstoffwechsel untersucht. Durch eine Veränderung des Phospholipidmusters - speziell der Membranphospholipide - könnten sich die adhäsiven Eigenschaften der Epithelzelle entscheidend ändern. Andererseits ist beschrieben, daß Fettsäuren, die aus Phospholipiden freigesetzt wurden, im Zuge der Makrophagenaktivierung in Prostaglandine eingebaut werden (Ferber, 1982; Schmidt et al., in press). Aus diesem Grund wurde der Einbau und die Freisetzung radioaktiver Arachidonsäure bei veschiedenen Phospholipiden unter dem Einfluß von Benzylaminen (100 µg/ml f.c.) an Knochenmarksmakrophagen untersucht (II, 19.5). Der Einbau der radioaktiven Fettsäure wurde nach 20 Stunden gemessen, die Freisetzung ebenfalls nach 20 Stunden und in einem Wiederholungsversuch nach 4 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt.

Tabelle 17: Einbau von $^{14}$C-Arachidonsäure nach 20 Stunden in Phospholipide von Knochenmarksmakrophagen.

| Benzylamin | Sphingomyelin | Lecithin | Cephalin |
|---|---|---|---|
| Kontrolle | 100 % | 100 % | 100 % |
| Bromhexin | 39 % | 135 % | 52 % |
| Ambroxol | 67 % | 106 % | 99 % |

Tabelle 18: Freisetzung von $^{14}$C-Arachidonsäure nach 20 Stunden aus Phospholipiden von Knochenmarksmakrophagen.

| Benzylamin | Sphingomyelin | Lecithin | Cephalin |
|---|---|---|---|
| Kontrolle | 100 % | 100 % | 100 % |
| Bromhexin | 152 % | 144 % | 164 % |
| Ambroxol | 165 % | 101 % | 107 % |

Tabelle 19: Freisetzung von $^{14}$C-Arachidonsäure nach 4 Stunden aus Phospholipiden von Knochenmarksmakrophagen.

| Benzylamin | Sphingomyelin | Lecithin | Cephalin |
|---|---|---|---|
| Kontrolle | 100 % | 100 % | 100 % |
| Bromhexin | 141 % | 151 % | 135 % |
| Ambroxol | 156 % | 103 % | 101 % |

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ersehen, daß unter dem Einfluß der Benzylamine der Einbau von radioaktiver Arachidonsäure in Lecithin auf Kosten des Einbaus in Sphingomyelin und Cephalin verstärkt wurde. Bei der Freisetzung der radioaktiven Fettsäure aus den Phospholipiden zeigte sich zwischen der 4 Stunden-Messung und der 20 Stunden-Messung kein signifikanter Unterschied. Aus allen Phospholipiden wurde durch die Benzylamine erhöht Fettsäure freigesetzt, was auf eine Aktivierung der Phospholipase $A_2$ schließen läßt. Bromhexin war dabei effektiver als Ambroxol, mit Ausnahme der Freisetzung von Arachidonsäure aus Sphingomyelin.

15. Makrophagenaktivierung durch Benzylamine

Aus den Untersuchungen über den Einfluß der Benzylamine auf den Phospholipidstoffwechsel war bekannt, daß eine erhöhte Freisetzung von Fettsäuren aus Phospholipiden stattfindet, was auf eine Aktivierung der Phospholipase $A_2$ schließen läßt. Die Aktivierung der Phospholipase $A_2$ findet aber auch im Zuge der Makrophagenaktivierung statt. Aktivierte Makrophagen können Sauerstoff-Radikale aussenden, die für Mikroorganismen toxisch sind (Murray and Cohn, 1980; Rietschel, 1978). Diese Sauerstoff-Radikale können im Chemilumineszenz-Verfahren gemessen werden. Die Messung erfolgte dabei über eine Stunde mit 60 Meßwerten, die als Kurve ausgedruckt wurden, um den Zeitpunkt des Aktivierungsmaximums festlegen zu können, wie auch durch Berechnung der Fläche unter der Kurve das Gesamtmaß der Aktivierung zu bestimmen. Als Referenzsubstanz diente Zymosan, das als sehr potenter Makrophagen-Aktivator gilt (II, 19.6). Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 20: Aktivierung von Makrophagen durch Bromhexin und Ambroxol im Vergleich zu Zymosan.

| Benzylamin | Aktivierungsmaximum | Gesamtaktivierung (Fläche unter der Kurve) |
|---|---|---|
| Zymosan | 34. Minute | 100 % |
| Bromhexin | 2. Minute | 1,7 % |
| Ambroxol | 2. Minute | 1,3 % |

Die Benzylamine bewirkten nach diesen Untersuchungen gegenüber der Referenz- substanz eine zwar frühe, aber um den Faktor 70 schwächere Makrophagenaktivierung.

16. Antiadhäsive Wirkung von synthetischem Surfactant

Das natürliche Surfactant wird von den Alveolarzellen vom Typ II in der Lunge gebildet und ausgeschieden und stellt eine Mischung aus verschiedenen Substanzen dar, deren Hauptkomponenten aus Cholesterol und Phospholipiden - speziell L-α-Dipalmitoyl-Lecithin - bestehen und deren Zusammensetzung innerhalb verschiedener Spezies und Entwicklungsstadien variiert. Es besitzt oberflächenspannungsherabsetzende Eigenschaften (Batenburg, 1980; Cosmi and Scarpelli, 1983; von Seefeld und Renovanz, 1978). Seine Synthese oder Sekretion wird beispielsweise von Ambroxol stimuliert (Bauer, 1978; Curti, 1978; Püschmann und Engelhorn, 1978).

Die Instillation eines synthetischen Surfactants - bestehend aus L-α-Dipalmitoyl-Lecithin und Cholesterol im Verhältnis 4:1 - bewirkt eine Heilung entzündlicher Prozesse (Reifenrath, 1983).

Daher wurde am Beispiel dieses synthetischen Surfactants im in vitro-Adhäsionsmodell untersucht, ob es auch protektive Eigenschaften bezüglich der bakteriellen Adhäsion besitzt.

Eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung des Surfactants konnte nicht nachgewiesen werden. Die Cytotoxizitätsbestimmung, für die von der Ausgangssuspension (200 mg Lipid/ml) durch Verdünnen mit PBS pH 5,5 eine Konzentrationsreihe hergestellt worden war, erbrachte einen zunehmenden toxischen Effekt ab 40 mg Lipid/ml bis 200 mg Lipid/ml. Die parallel dazu durchgeführte Messung des osmotischen Druckes zeigte, daß dieser in dem betreffenden Konzentrationsbereich unter den von der Zellkultur tolerierten Wert von 220 mOsmol gesunken war. Dies war darauf zurückzuführen, daß in den Verdünnungsstufen von 200 - 40 mg Lipid/ml, wo kein oder wenig PBS verwendet worden war, der niedrige osmotische Druck der Lipidsuspension zum Tragen kam und nicht durch den zellkulturgeeigneten osmotischen Druck von PBS ausgeglichen wurde.

Diese Ergebnisse sind in Abbildung 38, zusammen mit dem Einfluß der Surfactantkonzentrationen auf die Adhäsion im in vitro-Modell mit Lungenepithelzellen und Klebsiella pneumoniae WG 14 dargestellt. Damit wird auch erklärt, warum die Kurve, die eine kontinuierlich konzentrationsabhängige Adhäsionshemmung zeigt, im Bereich von 40 mg Lipid/ml abknickt. Hier überlagern sich adhäsionshemmende Einflüsse und eine steigende Sensitivität der Epithelzellen aufgrund des toxischen osmotischen Effektes. Die minimale antiadhäsive Konzentration, MAK, des synthetischen Sufactants liegt bei 200 ng/ml, die antiadhäsive Konzentration, mit der 50 % Hemmung erzielt wird, $AK_{50}$, bei 6 mg/ml, die antiadhäsive Konzentration, mit der 90 % Hemmung erreicht wird, $AK_{90}$, bei 30 mg/ml. Alle weiteren Versuche wurden daher mit 30 mg Lipid/ml durchgeführt.

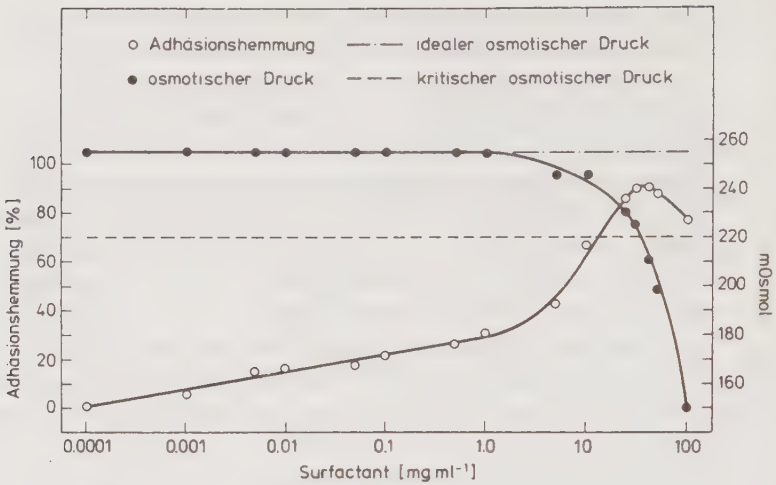



Abbildung 38: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen durch eine Konzentrationsreihe von synthetischem Surfactant und osmotischer Druck dieser Konzentrationsreihe. Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob die Adhäsionshemmung durch das synthetische Surfactant auf einer protektiven Beeinflussung der Epithelzellen oder einer Neutralisation der bakteriellen Adhäsionsstrukturen beruht. Dazu wurden vor dem Adhäsionsversuch die Epithelzellen und/oder Klebsiella pneumoniae WG 14 mit Surfactant vorinkubiert, für den Adhäsionsversuch wurde das Surfactant entweder von den vorbehandelten Adhäsionspartnern abgenommen oder zusätzlich frisch hinzugefügt (II, 20.6). Die Ergebnisse dieses Versuches sind aus Abbildung 39 zu ersehen. Die reine Vorinkubation, ohne zusätzliche Gabe von Surfactant bewirkte bei den

Epithelzellen eine stärkere Adhäsionshemmung als bei den Bakterien. Diese Wirkungen addierten sich, wenn beide Adhäsionspartner vorinkubiert wurden. Ein noch stärkerer Effekt zeigte sich in dem Fall, in dem keiner der Adhäsionspartner vorinkubiert wurde, sondern das Surfactant simultan mit den Bakterien zu den Epithelzellen gegeben wurde. Dieser Effekt konnte auch durch eine vorangehende Inkubation mit Surfactant nicht signifikant verstärkt werden.

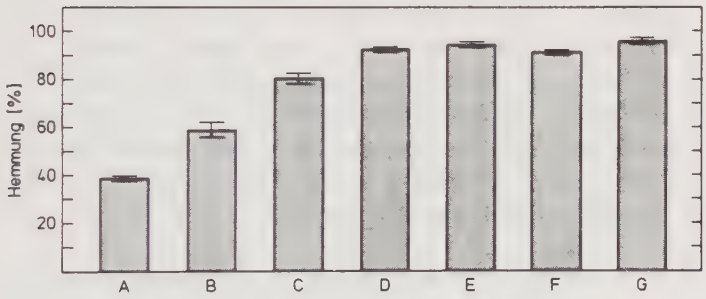



Abbildung 39: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14 an Lungenepithelzellen nach Inkubation mit synthetischem Surfactant.

A: die Bakterien wurden vorinkubiert
B: die Zellen wurden vorinkubiert
C: beide wurden getrennt vorinkubiert
A-C: Surfactant wurde vor dem Adhäsionsversuch entfernt
D: keiner wurde vorinkubiert
E: die Bakterien wurden vorinkubiert
F: Die Zellen wurden vorinkubiert
G: beide wurden getrennt vorinkubiert
D-G: Surfactant wurde beim Adhäsionsversuch zusätzlich hinzugefügt
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

Bezüglich einer therapeutischen Anwendung war weiterhin von Interesse, ob durch das Surfactant Bakterien lediglich an der Adhäsion gehindert werden oder inwieweit nach erfolgter Adhäsion diese wieder abgelöst werden können. Dazu wurden nach dem standardisierten Adhäsionsversuch die nicht-adhärenten Klebsiella pneumoniae WG 14 entfernt. Die Monolayer mit den adhärenten Bakterien wurden anschließend mit Surfactant überschichtet, wofür die Surfactantstammlösung (200 mg Lipid/ml) einmal mit PBS pH 5,5 und einmal mit BHI-Medium auf 30 mg Lipid/ml verdünnt worden war, um den Einfluß auf adhärente statische und adhärente wachsende Bakterien prüfen zu können (II, 20.7). Dieser Versuch wurde nach dem standardisierten radioaktiven in vitro-Adhäsionsmodell durchgeführt, in einem Parallelansatz mit nicht-markierten Bakterien wurden die Keimzahlen der adhärenten und nicht-adhärenten Bakterien nach Ausstreichen auf Agarplatten bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 21: Einfluß von Surfactant auf statische (PBS) und dynamische (BHI) adhärente Bakterien.

| Surfactant | Adhärente Bakterien | | Nicht-adhärente Bakterien | |
|---|---|---|---|---|
| | cfu | % cfu, dpm | cfu | % cfu, dpm |
| PBS (Kontrolle) | $1{,}60 \times 10^7$ | 73,5 | $0{,}58 \times 10^7$ | 26,5 |
| PBS-Surfactant | $1{,}50 \times 10^7$ | 66,5 | $0{,}75 \times 10^7$ | 33.5 |
| BHI (Kontrolle) | $1{,}40 \times 10^7$ | 61,0 | $0{,}89 \times 10^7$ | 39,0 |
| BHI-Surfactant | $0{,}64 \times 10^7$ | 27,5 | $1{,}70 \times 10^7$ | 72,5 |

Bei den bereits adhärenten Bakterien, die im Nährmedium die Möglichkeit zum Wachsen hatten, was den physiologischen Bedingungen entspricht, konnte mit Surfactant im

Vergleich zur Kontrolle eine um 55 % schächere Adhäsion festgestellt werden. Die statischen adhärenten Bakterien konnten verglichen mit der Kontrolle nicht signifikant beeinflußt werden.

Um zu überprüfen, ob die Adhäsionshemmung durch Surfactant noch für weitere lungenrelevante Keime Gültigkeit hat, wurden im in vitro-Adhäsionsmodell mit Lungenepithelzellen außer Klebsiella pneumoniae WG 14 noch Haemophilus influenzae BC 31 und Streptococcus pneumoniae ATCC 6302 getestet. Gleichzeitig wurde in diesem Versuch noch der Einfluß verschiedener Lysolecithin-Gehalte im synthetischen Surfactant untersucht, das in diesem Fall in einer Konzentration von 20 mg Lipid/ml eingesetzt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 40 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß die Adhäsion von Haemophilus influenzae durch Surfactant noch stärker gehemmt wurde als die von Klebsiella pneumoniae. Bei Streptococcus pneumoniae war die Adhäsion unter dem Einfluß von Surfactant im Vergleich zur Kontrolle gesteigert und wurde erst durch steigende Lysolecithin-Gehalte gesenkt. Bei den beiden Surfactant-sensitiven Keimen bewirkte der steigende Lysolecithin-Gehalt ebenfalls einen verstärkten Hemm-Effekt. Ab etwa 12 % Lysolecithin-Gehalt kann allerdings zusätzlich eine beginnende Cytotoxizität gesehen werden.

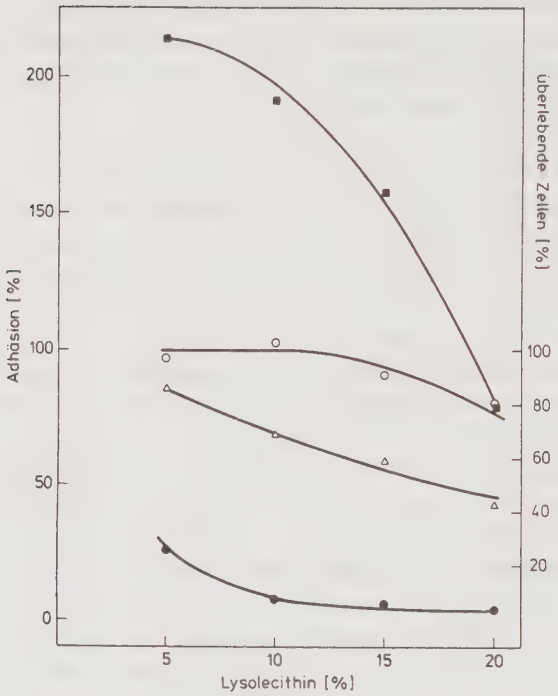



Abbildung 40: Hemmung der Adhäsion von Klebsiella pneumoniae WG 14, Haemophilus influenzae BC 31 und Streptococcus pneumoniae ATCC 6302 an Lungenepithelzellen durch synthetisches Surfactant mit verschiedenen Lysolecithin-Konzentrationen und Cytotoxizität dieser Konzentrationen.
○ Cytotoxizität, ■ Sc. pneumoniae, △ K. pneumoniae, ● H. influenzae.
Puffer-Kontrolle = 100 % Adhäsion

# IV DISKUSSION

Die Möglichkeit, eine bakterielle Infektion bereits im Anfangsstadium zu verhindern, ist eine verlockende Vorstellung. Entsprechend ist auch das Interesse an diesem Forschungsgebiet seit 1970 stark gestiegen. Erste Erfolge sind nicht nur in vitro zu verzeichnen, sondern auch bei freiwilligen Versuchspersonen und im größeren Maßstab in der Nutztierzucht, wobei die Möglichkeiten und Grenzen einer Antiadhäsiva-Therapie realistisch gegeneinander abgewogen werden müssen und potentielle Gefahren kritisch betrachtet werden müssen.

Generell kann gesagt werden, daß antiadhäsive Agenzien nie einen Einfluß auf die Interaktion zwischen Keim und Phagozyten haben sollten. Einige Arbeitsgruppen warnen deshalb vor dem wahllosen Gebrauch von frei diffusiblen kompetitiven Inhibitoren, die schädlich für den Wirt in den Fällen sein können, in denen die Eliminierung der Organismen von einer Phagozytose abhängig ist (Bar-Shavit et al., 1977, 1980; Silverblatt et al., 1979). Ein weiteres Problem, nämlich die Ausschwemmung der natürlichen Darm-Flora eines Organismus oder zumindest eine Veränderung ihrer Zusammensetzung, ist bereits aus der Antibiotika-Therapie bekannt.

Einen echten prophylaktischen Langzeitschutz kann die Vakzinierung mit gereinigten Adhäsionsstrukturen darstellen. In der Nutztierzucht konnte eine wirksame Vorbeugung vor Diarrhoe mit Hilfe von E.coli -K 88-, -K 99- und -987- Piliimpfstoffen bei Nachkommen von geimpften Muttertieren erzielt werden (Isaacson et al., 1980; Morgan et al., 1978; Nagy et al., 1978). Erste Versuche an Menschen laufen mit Typ I-Pili-Impfstoffen aus enterotoxischen E.coli-Stämmen oder Gonokokkenfimbrien-Impfstoffen. Mit Dosen von 45 - 2000 µg Adhäsin-Protein wurde eine starke humorale Immunantwort erreicht, im oberen Dosisbereich auch ein Schutz vor der nachfolgenden Infektion (Boslego et al., 1980; Brinton et al.,

1980; Rutter and Jones, 1973; Siegal and Buchanan, 1980; Tramont et al., 1980). Zu diesem Komplex sind noch umfangreiche Studien über die Antigenheterogenität der Adhäsionsstrukturen der pathogenen Stämme notwendig. Vielversprechend ist, daß die Rezeptorbindungsstellen der Adhäsine verschiedener Stämme gemeinsame Immundeterminanten aufweisen (Brinton et al., 1980; Siegal and Buchanan, 1980; Tramont et al., 1980). Impfstoffe, die aus Adhäsinuntereinheiten, die diese Determinanten enthalten, hergestellt würden, könnten sich schützend für eine Vielzahl pathogener Stämme erweisen.

Im Gegensatz dazu könnte sich eine Therapie mit Adhäsinanaloga als Kurzzeitschutz - aufgrund der Spezifität - bei bestimmten Infektionen bewähren. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit war ein Versuch gemacht worden, mit isolierten Pili von Klebsiella pneumoniae WG 14 die Adhäsion dieses Stammes und 5 weiterer Klebsiella pneumoniae-Stämme an Lungenepithelzellen zu hemmen. Dies gelang beim Donorstamm und etwas schwächer bei einem zweiten Stamm (III. 10), was ebenfalls für die Spezifität dieser Ligand-Rezeptor-Bindung spricht, aber prinzipiell die Möglichkeit einer Adhäsionshemmung mit gereinigten Adhäsinen oder Analoga bestätigt.

Eine ähnliche Wirkung, nämlich ein akuter, zeitlich begrenzter Schutz, ist bei der Therapie mit gereinigten Rezeptoren, Rezeptoranaloga oder Zuckern als essentiellen Rezeptorbestandteilen zu erwarten (Aronson et al., 1979; Duguid and Old, 1980; Gibbons and Qureshi, 1979; Schaeffer et al., 1980). Auch hier wird die Spezifität der Bindung einen limitierenden Faktor für das Wirkungsspektrum darstellen. Allerdings ist im Falle der Zucker aus zahlreichen Studien zur Identifizierung von Wirtszellrezeptoren bekannt, daß die Variation der Rezeptorzucker in den Polysacchariden, Glycolipiden und Glycoproteinen begrenzt ist (Beachey, 1981, 1982). Hauptsächlich kommen vor: Mannose, Fucose, Glucose,

Galactose und N-Acetylgalactosamin. Es besteht also die Möglichkeit, durch eine geschickt ausgewählte Kombination von Mono-, Di- oder Trisacchariden einen großen Teil des in Frage kommenden Spektrums abzudecken. Dabei muß aber beachtet werden, daß diese Zucker weder für den Mikroorganismus noch für den Wirtsorganismus metabolisierbar sein sollten - was durch Derivatisierung oder ungewöhnliche Verknüpfungen erreicht werden kann - und nicht zu einer Toxizität für den Wirtsorganismus, zum Beispiel durch Blockieren wichtiger Synthesewege, führen dürfen. Die adhäsionshemmende Wirkung von Zukkern konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, wo innerhalb einer breiten Palette von derivatisierten Monosacchariden und ungewöhnlichen Oligosacchariden Methyl-α-D-Glucose und Methyl-α-D-Xylose in einer Konzentration von 50 µg/ml eine 50 %ige Adhäsionshemmung bei Klebsiella pneumoniae zeigten.Ebenfalls hemmend wirkte die 5-Amino-5-Desoxy-Glucose (Nojirimycin), wobei dieser Effekt von der Amylase-Inhibitor-Wirkung dieses Antibiotikums überlagert sein könnte, worauf in einem späteren Abschnitt eingegangen wird. Die gute Verträglichkeit dieser Zucker im Zellkultur-System, das als sehr sensibel anzusehen ist, läßt ebenfalls auf eine geringe Toxizität in vivo schließen.

Eine faszinierende Möglichkeit der Antiadhäsiva-Therapie, die vermutlich weniger stark der Spezifität der bakteriellen Assoziation mit tierischen Zellen unterworfen ist, liegt in der Beeinflußung der Adhäsionsstrukturen durch subletale Antibiotikadosen. Auf diese Weise können mit Antibiotika-Spiegeln, die normalerweise nicht ausreichen, um bakteriostatisch oder bakterizid zu wirken, Mikroorganismen aus dem Wirtsorganismus ausgeschwemmt werden. Als Wirkungsmechanismen werden diskutiert: Vollständige oder partielle Hemmung der Synthese von Piliproteinen oder anderen Membranprotein-Strukturen, Sphäroblastenbildung, filamentöses Wachstum oder Störung der Insertion von Adhäsionsstrukturen im

Mureinsacculus (Nakao et al., 1981; Pan et al., 1979; Svanborg-Eden et al., 1979; Tylewska et al., 1981; Väisänen et al., 1982; Vosbeck et al., 1980, 1982). In dieser Arbeit konnte eine 22 %ige Adhäsionshemmung nach Vorinkubation von Klebsiella pneumoniae mit Neomycin (1/8 MHK) beobachtet werden, eine eher gesteigerte Adhäsion mit anderen Antibiotika. Dies läßt sich vielleicht damit erklären, daß die Antibiotika nach der Inkubation der Bakterien nicht vollständig durch Spülen entfernt oder aus den Bakterien wieder freigesetzt worden waren und, da sie aufgrund der Resistenz des Stammes hochdosiert eingesetzt worden waren, zu einem cytotoxischen Effekt führten. Potentielle Gefahren, wie z.B. Resistenzentwicklung, müssen in diesem Teilbereich der Antiadhäsiva-Forschung noch sorgfältig geprüft werden und stehen der Anwendung als Antiadhäsiva entgegen.

Die Bedeutung der bakteriellen Adhäsion und ihrer Hemmung kann in Zukunft dazu führen, daß verschiedene teil- oder vollsynthetische, nicht antibakterielle Substanzen, die unter Umständen bereits für andere Indikationsgebiete eingeführt sind, auf eine potentielle antiadhäsive Wirkung überprüft werden. Ausgehend von dem Gedanken, daß Substanzen, die die Aggregation von Thrombozyten hemmen, auch die Assoziation von Mikroorganismen mit Säugerzellen hemmen können, wurden daher im Rahmen dieser Arbeit Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation mit verschiedenen Wirkungsmechanismen untersucht. Diese Arbeitshypothese konnte für zwei Vertreter der Phosphodiesteraseinhibitoren und einen Prostaglandin $I_2$-Aktivator, die die Adhäsion von Klebsiella pneumoniae an Lungenepithelzellen um 30 % und 55 % bzw. 45 % hemmten, bestätigt werden. Auch in diesem Fall bleibt zu prüfen, welche Auswirkungen diese Hemmstoffe bei einer antiadhäsiven Therapie auf den cAMP- und Prostaglandin-Haushalt des Organismus haben. Dennoch können diese Verbindungen als Leitstrukturen für die weitere Synthese von Antiadhäsiva angesehen werden.

Anlaß zur Bearbeitung der Benzylamine innerhalb der vorliegenden Arbeit waren Berichte über beschleunigte Heilungsprozesse und erhöhte bakterielle Clearance bei Infektionen unter Benzylamintherapie (Krüger, 1983; Pido et al., 1976; Siasco and Palillo, 1979; Ziv, 1983), ohne daß eine antibakterielle Wirkung oder eine Beeinflußung der Cilienmotorik nachgewiesen werden konnte (Assher, 1982, Krüger, 1983). Dies ließ den Rückschluß auf einen antiadhäsiven Wirkungsmechanismus zu.

Da die Kenntnis des Wirkungsmechanismus eines Arzneimittels den Therapie-Erfolg auf eine rational faßbare Ebene bringt und zusätzlich relevante, rationell durchführbare Testsysteme für die Profilierung weiterer Entwicklungssubstanzen liefert, lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Untersuchung der antiadhäsiven Wirkung von Benzylaminen, Arzneimittel, die bereits in der Therapie von Infektionen des Respirationstraktes eingesetzt werden. Um den Verhältnissen der bakteriellen Infektion des Respirationstraktes annähernd gerecht zu werden, wurde ein in vitro-Adhäsionsmodell mit Lungenepithelzellen und lungenrelevanten Krankheits-Erregern - Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae und Streptococcus pneumoniae - entwickelt. Dazu war es notwendig, die Korrelation zwischen Ausbildungsgrad der Adhäsionsstrukturen, in vitro-Adhäsivität und in vivo-Infektiösität zu prüfen. Am Beispiel von Klebsiella pneumoniae konnte eine eindeutige Korrelation zwischen Pilibesatz und in vitro-Adhäsivität bei 6 Stämmen nachgewiesen werden. Die Korrelation zur in vivo-Infektiösität, die zur Vermeidung vieler Tierexperimente nur an 3 Stämmen untersucht wurde, konnte prinzipiell bestätigt werden. Die Beurteilung erwies sich jedoch als schwierig, da beim Infektionsverlauf nicht immer klar differenziert werden kann, welchen Einfluß Adhäsivität, Invasivität, Toxinbildung und unterschiedliche in vivo-Wachstumsraten haben. Trotzdem konnte aus den erhaltenen in vivo Daten die Relevanz des in vitro Adhäsion-Testmodells zur Prüfung von Antiadhäsiva bestätigt werden.

In diesem in vitro-Adhäsionsmodell mit Lungenepithelzellen und Klebsiella pneumoniae WG 14 konnte eine Adhäsionshemmung durch verschiedene Benzylamine nachgewiesen werden, die aber 35 % Hemmung nicht überschritt. Dies könnte darin begründet sein, daß die Benzylamine nur einen Teil der Rezeptoren auf der Epithelzelle absättigen oder die Inkubationszeit im Adhäsionsmodell zu kurz war, um Veränderungen des Phospholipidmusters genügend auszuprägen.

Da man sich ferner vorstellen kann, daß eine antiadhäsive Wirkung auch auf sekundären Effekten beruht, die von einer Zellkultur allein nicht realisiert werden, wurden weitere Versuche nach einer ex vivo-Methode durchgeführt. Dazu wurde Lungenwaschwasser aus Bromhexin- oder Ambroxol-behandelten und nicht behandelten Tieren gewonnen und im in vitro-Adhäsionsmodell auf seine adhäsiven Eigenschaften untersucht. Nach Auftrennung der Lungenwaschwasserproben mittels präparativer Isoelektrofokussierung wurden bei reproduzierbaren isoelektrischen Punkten Mediatorproteine gefunden, die die Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle steigerten. Bei Ambroxol-behandelten Tieren wurde diese Steigerung um durchschnittlich 50 % reduziert. Eines dieser Mediatorproteine konnte als α-Amylase identifiziert werden. Da nicht nur die aus der Lunge isolierte α-Amylase adhäsionsbegünstigend wirkte, sondern auch käufliche α-Amylase aus Pankreas, und da die Reduktion der Amylase-bedingten Adhäsionssteigerung durch die Benzylamine auch in vitro erfolgte, steht somit eine relativ einfache Methode zur Verfügung, die Effektivität verschiedener Benzylaminderivate zu testen.

Ambroxol und Bromhexin beeinflussen nur die adhäsionssteigernde Wirkung der α-Amylase, nicht aber ihre katalytische Aktivität bezüglich der Amylopektinspaltung. Daraus könnte man schließen, daß α-Amylase über zwei aktive Zentren verfügt, von denen das für die Adhäsion verantwortliche durch die Benzylamine blockiert wird.

Alternativ dazu wäre vorstellbar, daß das aktive Zentrum der α-Amylase in vivo zusätzlich durch Spaltung von Oligosacchariden endständige Zucker freisetzt, die die Interaktion Ligand-Rezeptor begünstigen. Durch die Bindung der Benzylamine an die α-Amylase könnte eine Konformationsänderung entstehen, die zwar noch eine Amylopektin-Spaltung ermöglicht, eine Oligosaccharid-Spaltung jedoch verhindert.
Im in vitro-Adhäsionsmodell mit Lungenepithelzellen konnte nachgewiesen werden, daß die Adhäsionsmediatorwirkung der α-Amylase kein spezifischer Effekt bei Klebsiella pneumoniae ist, sondern auch für Haemophilus influenzae und Streptococcus pneumoniae gilt, womit drei der relevantesten Erreger von Infektionen des Respirationstraktes erfaßt sind.

Da von den Benzylaminen nicht nur der als α-Amylase identifizierte Adhäsionsmediator gehemmt wird, sondern auch in vergleichbarem Maß die anderen Mediatorproteine, bleibt zu prüfen, welcher Natur diese weiteren Mediatoren sind und ob eventuell Gemeinsamkeiten bestehen.
Mit diesem Wirkprinzip - Hemmung der Adhäsion durch Neutralisierung der Amylase-Mediator-Wirkung - könnte auch die bereits erwähnte Adhäsionshemmung durch 5-amino-5-desoxy-Glucose (Nojirimycin) erklärt werden, die als Amylase-Inhibitor bekannt ist. Da dieser Hemm-Effekt im Zellkultur-Modell gefunden wurde, müßte überprüft werden, ob von den kultivierten Epithelzellen Amylase ausgeschieden wird, deren adhäsionssteigernde Wirkung von Nojirimycin neutralisiert wird.

Zwei weitere Sekundär-Effekte von Bromhexin und Ambroxol, die Beeinflußung des Phospholipidstoffwechsels durch Aktivierung der Phospholipase $A_2$ und die Makrophagenaktivierung, die in dieser Arbeit in vitro nachgewiesen wurden, könnten in vivo ebenfalls für den therapeutischen Effekt von Relevanz sein.

Da aus den Studien einiger Arbeitsgruppen bekannt ist, daß zumindest Ambroxol als ein Vertreter der Benzylamine die Synthese und/oder die Sekretion von Surfactant stimuliert (Bauer, 1978; Curti, 1978; Püschmann und Engelhorn, 1978), und daß diese Phospholipid-Komposition als synthetisches Produkt mittels Instillationstherapie erfolgreich bei Infektionen der Lunge und der Harnblase eingesetzt wurde (Reifenrath, 1983), wurden die antiadhäsiven Eigenschaften von synthetischem Surfactant im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es zeigte sich, daß im in vitro-Adhäsionsmodell mit Lungenepithelzellen und Klebsiella pneumoniae die Adhäsion konzentrationsabhängig durch Surfactant fast vollständig gehemmt wurde. Ein Problem stellte der niedrige osmotische Druck des Surfactants dar, was dadurch behoben werden konnte, daß die Lipidsuspension mit Sorbit isoton eingestellt wurde.
In dem Fall, wo einer der beiden Adhäsionspartner vor dem Adhäsionsversuch mit Surfactant inkubiert wurde, Surfactant aber beim Adhäsionsvorgang nicht anwesend war, erschien die Vorinkubation der Epithelzellen effektiver als die der Bakterien. Eine stärkere Wirkung konnte aber ohne Vorinkubation durch direkte Zugabe von Surfactant zum Adhäsionsversuch erzielt werden. Diese Tatsache ebenso wie die, daß durch Surfactant bereits adhärente, sich vermehrende Bakterien wieder von den Epithelzellen abgelöst werden können, würde auf eine eher akute als prophylaktische Anwendung von Surfactant hinzielen. Die Relevanz einer Surfactant-Therapie für verschiedene Erreger von Infektionen des Respirationstraktes wurde zusammen mit dem Einfluß verschiedener Lysolecithin-Konzentrationen an Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae und Streptococcus pneumoniae untersucht. Dabei erwies sich die Adhäsion von Klebsiella pneumoniae und noch ausgeprägter die von Haemophilus influenzae als Surfactant-sensitiv. Der Hemm-Effekt wurde durch steigende Lysolecithin-Konzentrationen

noch verstärkt. Die Adhäsion von Streptococcus pneumoniae wurde erst bei hohen Lysolecithin-Gehalten von 20 % gehemmt.

Diese Untersuchungen könnten Hinweise dafür sein, daß Benzylamine wie Bromhexin und Ambroxol aufgrund einer primären Wirkung Rezeptoren auf den Lungenepithelzellen für Klebsiella pneumoniae blockieren oder verändern. Der Schwerpunkt der antiadhäsiven Wirkung, vor allem von Ambroxol, scheint jedoch auf sekundären Effekten zu beruhen, wie der Neutralisation von Adhäsionsmediatoren, Aktivierung der Phospholipase $A_2$ und eventuell von Makrophagen sowie der Stimulierung von Surfactant, dessen antiadhäsive Wirkung in dieser Arbeit bewiesen wurde. Diese primären und sekundären antiadhäsiven Effekte der Benzylamine sind damit ein Teilaspekt, der die Therapie-Erfolge von Bromhexin und Ambroxol bei Infektionen des Respirationstraktes erklären läßt. Der durch den antiadhäsiven Effekt von Bromhexin und Ambroxol bedingte, erniedrigte Keimgehalt in der Lunge sollte in vivo eine Antibiotica-Therapie begünstigen.

## V ZUSAMMENFASSUNG

Für die Untersuchung von Antiadhäsiva, speziell von Benzylaminen und synthetischem Surfactant, deren vorrangiges Einsatzgebiet Infektionen des Respirationstraktes sind, wurde ein anwendungsnahes in vitro- und ex vivo-Adhäsionsmodell mit menschlichen Lungenepithelzellen und den drei Lungen-relevantesten bakteriellen Erregern, Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae und Streptococcus pneumoniae entwickelt.
Eine Korrelation zwischen dem elektronenmikroskopisch sichtbaren Ausbildungsgrad der Adhäsionsstrukturen, der in vitro-Adhäsivität und der in vivo-Infektiösität konnte am Beispiel von drei Klebsiella pneumoniae-Stämmen aufgestellt werden.

Die Relevanz des epithelialen Rezeptors und der bakteriellen Liganden konnte bestätigt werden, da sowohl der enzymatische Abbau des Rezeptors mit Neuraminidase und Papain wie auch die Vorinkubation der Epithelzellen mit isolierten Pili zu einer Adhäsionshemmung führten. Eine Spezifität der Ligand-Rezeptor-Bindung konnte gezeigt werden.

Eine Hemmung der Adhäsion durch Absättigung der bakteriellen Adhäsionsstrukturen mit Zuckern, den essentiellen Rezeptorbestandteilen, konnte nachgewiesen werden. Im Falle von Klebsiella pneumoniae wirkten Methyl-α-D-Xylose, Methyl-α-D-Glucose und 5-Amino-5-Desoxy-Glucose (Nojirimycin) antiadhäsiv.

Eine Adhäsionshemmung über die Beeinflussung der Bakterienultrastruktur konnte durch Inkubation von Klebsiella pneumoniae mit Neomycin in der Konzentration 1/8 MHK erzielt werden.

Mit zwei Vertretern der Phosphodiesterase-Inhibitoren und einem Prostaglandin $I_2$-Aktivator aus der Gruppe der Thrombozytenaggregationshemmer konnte die Adhäsion von Klebsiella pneumoniae ebenfalls inhibiert werden.

Im in vitro-Adhäsionsmodell mit Lungenepithelzellen und Klebsiella pneumoniae wirkten sechs der geprüften Benzylamin-Derivate antiadhäsiv. Bei ex vivo-Versuchen konnten im aufgetrennten Lungenwaschwasser von Bromhexin- oder Ambroxol-behandelten und Placebo-behandelten Ratten bei reproduzierbaren isoelektrischen Punkten adhäsionssteigernde Proteine nachgewiesen werden. Bei den Benzylamin-behandelten Tieren war diese Steigerung reduziert. Eines dieser Mediatorproteine aus der Lunge konnte als α-Amylase identifiziert werden.
Auch gekaufte α-Amylase steigerte konzentrationsabhängig die Adhäsion. Dieser Mediator-Effekt konnte in vitro ebenfalls durch Bromhexin und Ambroxol gehemmt werden, wobei die katalytische Aktivität des Enzyms nicht beeinflußt wurde. Die Amylase-bedingte Adhäsionssteigerung konnte auch bei Haemophilus influenzae und Streptococcus pneumoniae nachgewiesen werden. Damit wurde ein wichtiger antiadhäsiver Sekundär-Effekt der Benzylamine nachgewiesen und eine einfache Methode zur Evaluierung neuer Benzylaminderivate entwickelt.

Mit dem Nachweis der Aktivierung der Phospholipase $A_2$ und der Makrophagenaktivierung, die Adhäsions-beeinflussende Faktoren sein können, wurden zwei weitere Wirkungsmechanismen der Benzylamine gefunden.

Ein zusätzlicher antiadhäsiver Effekt der Benzylamine, die zum Teil Stimulatoren des Surfactant sind, wurde damit nachgewiesen, daß Surfactant konzentrationsabhängig, akut und prophylaktisch die Adhäsion hemmt, d.h. bereits adhärente, sich vermehrende Bakterien wie-

der von den Epithelzellen ablöst. Dies gilt für Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae und bedingt für Streptococcus pneumoniae.

Mit den in dieser Arbeit gefundenen antiadhäsiven Wirkprinzipien von Benzylaminen können die therapeutischen Erfolge dieser Substanzklasse bei Infektionen des Respirationstraktes zum Teil erklärt werden. Die etablierten Testmodelle können zur Evaluierung weiterer Leitstrukturen sinnvoll eingesetzt werden.

## VI LITERATUR

Acres, S.D., Isaacson, R.E., Babiuk, L.A., Kapitany, R.A. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K 99 antigen and whole cell bacterins. Infec. Immun. 25, 121-126, 1979.

Alkan, M.L., Beachey, E.H. Excretion of lipoteichoic acid by group A streptococci: influence of penicillin on excretion and loss of ability to adhere to human oral epithelial cells. J. Clin. Invest. 61, 671-677, 1978.

van Alphen, L., Riemens, T., Poolman, Y., Zanen, H. Characteristics of major outer membrane proteins of Haemophilus influenzae. Journal of Bacteriology 155,2, 878-885, 1973.

Andersson, B., Eriksson, B., Falsen, E., Fogh, A., Hanson, A., Nylen, O., Peterson, H., Svanborg-Eden, C. Adhesion of Streptococcus pneumoniae to human pharyngeal epithelial cells in vitro: difference in adhesive capacity among strains isolated from subjects with otitis media, septicemia, or meningitis of from healthy carriers. Infec. Immun. 32, 311-317, 1981.

Aronson, M., Medalia, O., Schori, L., Mirelman, D., Sharon, N., Ofek, I. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with Escherichia coli by blocking bacterial adherence with methyl α-D-mannopyranoside. J. Infect. Dis. 139, 329-332, 1979.

Assher, A.W. Unveröffentlichte Daten, 1982.

Bammann, L.L., Clark, W.B., Gibbons, R.J. Impaired colonization of gnotobiotic and conventional rats by streptomycin-resistant strains of Streptococcus mutans. Infect. Immun. 22, 721-726, 1978.

Banai, M., Kahane, I., Bredt, W., Razin, S. Membrane components of Mycoplasma pneumoniae involved in adherence of the organism to red blood cells. Isr. J. Med. Sci. 16, 69, 1980.

Bar-Shavit, Z., Ofek, I., Goldman, R., Mirelman, D., Sharon, N. Mannose residues on phagocytes as receptors for the attachment of Escherichia coli and Salmonella typhi. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 455-460, 1977.

Bar-Shavit, Z., Ofek, I., Goldman, R., Mirelman, D., Sharon, N. Mannose-binding activity of Escherichia coli: a determinant of attachment and ingestion of the bacteria by macrophages. Infec. Immun. 29, 417-424, 1980.

Batenburg, J.J. Isolated typ II cells from fetal lung as model in studies on the synthesis and secretion of pulmonary surfactant. Lung 158, 177-192, 1980.

Bauer, E. Lezithin- und Dipalmitoyllezithinsynthese in der fetalen Mäuselunge, Einfluß von Ambroxol und Betamethason. Atemwegs- und Lungenkrankheiten 4, 1. Beiheft, 22-29, 1978.

Beachey, E.H. Binding of group A streptococci to human oral mucosal cells by lipoteichoic acid. Trans Assoc. Am. Physicians 88, 285-292, 1975.

Beachey, E.H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J. Infect. Dis. 143,3, 325-345, 1981.

Beachey, E.H., Eisenstein, B.I., Ofek, I. Sublethal antibiotics and bacterial adhesion, in: Adhesion and microorganism pathogenicity. Pitman Medical, Tunbridge Wells, England, 1981.

Beachey, E.H. Die Adhärenz von Bakterien an Schleimhautoberflächen (Übersetzung). Immun. Infekt. 10, 51-56, 1982.

Boslego, J., McChesney, D., Sadoff, J., Ciak, J., Tramont, E. Human genital secretion antibody response to a gonococcal pilus vaccine [abstract no. 420], in: Proceedings and Abstracts of the 20th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, 1980. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1980.

Brecher, S.M., van Houte, J. Relationship between host age and susceptibility to oral colonization by Actinomyces viscosus in Sprague-Dawley rats. Infect. Immun. 26, 1137-1145, 1979.

Brinton, C., Brown, A., Rogers, K., Guerina, N., Wood, S., Bryan, J., Labik, A., Polen, S., Lee, S. Preparation, testing, safety, antigenicity, immunogenicity and serological specificity of a purified gonococcus pilus vaccine for gonorrhea, in: J.D. Nelson and C. Grassi [ed.]. Current chemotherapy and infectious diseases. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1242-1245, 1980.

Buchanan, T.M., Pearce, W.A. Pili as a mediator of the attachment of gonococci to human erythrocytes. Infec. Immun. 13, 1483-1489, 1976.

Cheney, C.P., Schad, P.A., Formal, S.B., Boedeker, E.C. Species specificity of in vitro Escherichia coli adherence to host intestinal cell membranes and its correlation with in vivo colonization and infectivity, Infec. Immun. 28, 1019-1027, 1980.

Cisar, J.O., Vatter, A.E. Surface fibrils (fimbriae) of Actinomyces viscosus T14V. Infect. Immun. 24, 523-531, 1979.

Cosmi, E.V., Scarpelli, E.M. Pulmonary surfactant system. Proceedings of the International Symposium on the Surfactant System of the Lung held in Rome, Italy, March 2-4, 1983.

Craven, D.E., Frasch, C.E. Pili-mediated and nonmediated adherence of Neisseria meningitidis and its relationship to invasive disease, in: Brooks, G.F., Gotschlich, E.C., Holmes, K.K., Sawyer, W.D., and Young, F.E. [ed.]. Immunobiology of Neisseria gonorrhoeae. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 250-252, 1978.

Curti, P. Der Einfluß von Amphotericin B und Ambroxol auf den alveolären Surfactant, dagestellt an einem Fall von Kryptokokkose. Atemwegs- und Lungenkrankheiten 4, 1. Beiheft, 68-70,1978.

Davis, C.P., Savage, D.C. Effect of penicillin on the succession, attachment, and morphology of segmented, filamentous microbes in the murine small bowel. Infect. Immun. 13, 180-188, 1976.

Duguid, J.P., Gillies, R.R. Fimbriae and haemagglutinating activity in Salmonella, Klebsiella, Proteus and Chromobacterium. Journal of Pathology and Bacteriology 75, 519-520, 1958.

Duguid, J.P. Fimbriae and adhesive properties in Klebsiella strains. J. Gen. Microbiol. 21, 271-286, 1959.

Duguid, J.P., Anderson, E.S., Campbell, I. Fimbriae and adhesive properties in salmonellae. J. Path. Bact. 92, 107-138, 1966.

Duguid, J.P., Old, D.C. Adhesive properties of Enterobacteriaceae, in: E.H. Beachey [ed.]. Bacterial adherence. Chapman and Hall, London; Methuen, New York, 184-217, 1980.

Eisenstein, B.I., Ofek, I., Beachey, E.H. Ribosomal misreading of mRNA prevents binding of Escherichia coli to mannose receptors on human epithelial cells. Clin. Res. 26, 523A, 1978 a.

Eisenstein, B.I., Ofek, I., Beachey, E.H. Interference with the mannose binding and epithelial cell adherence of Escherichia coli by sublethal concentrations of streptomycin. Clin. Res. 26, 675A, 1978 b.

Eisenstein, B.I., Ofek, I., Beachey, E.H. Interference with mannose binding and epithelial cell adherence of Escherichia coli by sublethal concentrations of streptomycin. J. Clin. Invest. 63, 1219-1228, 1979.

Eisenstein, B.I., Beachey, E.H., Ofek, I. Influence of sublethal concentrations of antibiotics on the expression of the mannose-specific ligand of Escherichia coli. Infec. Immun. 28, 154-159, 1980.

Eisenstein, B.I., Ofek, I., Beachey, E.H. Loss of lectinlike activity in aberrant type 1 fimbriae of Escherichia coli. Infec. Immun. 31, 792-797, 1981.

Elbein, A.D., Sanford, B.A., Ramsay, M.A. Parr, Y.T. Effect of inhibitors of glycoprotein biosynthesis and bacterial adhesion, in: Adhesion and microorganism pathogenicity. Pitman Medical, Tunbridge Wells, England, 1981.

Ellen, R.P., Gibbons, R.J. Parameters affecting the adherence and tissue tropisms of Streptococcus pyogenes. Infect. Immun. 9, 85-91, 1974.

Fader, R.C., Avots-Avotins, A., Davis, C.P. Evidence for pilimediated adherence of Klebsiella pneumoniae to rat bladder epithelial cells in vitro. Infect. Immun. 25, 729-737, 1979.

Fainstein, V., Musher, D.M. Bacterial adherence to pharyngeal cells in smokers, nonsmokers, and chronic bronchitics. Infect. Immun. 26, 178-182, 1979.

Ferber, E. Persönliche Mitteilung, 1982.

Force, F.M., Kelly, W.J., Huber, G.L. Inactivation of staphylococci by alveolar macrophages with preliminary observations on the importance of alveolar lining material. American Review of Respiratory Disease 108, 784-790, 1973.

Fowler, J.E., Jr., Stamey, T.A. Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VII. The role of bacterial adherence. J. Urol. 117, 472-476, 1977.

Freter, R. Prospects for preventing the association of harmful bacteria with host mucosal surfaces, in: E.H. Beachey [ed.]. Bacterial adherence. Chapman and Hall, London; Methuen, New York, 439-458, 1980.

Gibbons, R.J., Spinnell, D.M., Skobe, Z. Selective adherence as a determinant of the host tropisms of certain indigenous and pathogenic bacteria. Infect. Immun. 13, 238-246, 1976.

Gibbons, R.J. Adherence of bacteria to host tissue, in: D. Schlessinger [ed.]. Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 395-406, 1977.

Gibbons, R.J., Qureshi, J.V. Inhibition of adsorption of Streptococcus mutans strains to saliva-treated hydroxyapatite by galactose and certain amines. Infect. Immun. 26, 1214-1217, 1979.

Gorini, L. Streptomycin and misreading of the genetic code, in: M. Nomura, A. Tissieres, and P. Lengyel [ed.]. Ribosomes. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 791-803, 1974.

Green, G.M., Jakob, G.J., Low, R.B., Davis, G.S. Defense mechanisms of the respiratory membrane. American Review of Respiratory Disease 115, 479-514, 1977.

Huang, A.S., Okorie, T.G. Surface analysis by bacterial adherence to virus-infected cells. J. Infect. Dis. 140, 147-151, 1979.

Isaacson, R.E., Dean, E.A., Morgan, R.L., Moon, H.W. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic Escherichia coli-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified K99 or 987 pili: antibody production in response to vaccination. Infec. Immun. 29, 824-826, 1980.

Johanson, W.G., Jr., Woods, D.E., Chaudhuri, T. Association of respiratory tract colonization with adherence of gram-negative bacilli to epithelial cells. J. Infect. Dis. 139, 667-673, 1979.

Johanson, W.G., Jr., Higuchi, J.H., Chaudhuri, T.R., Woods, D.E. Bacterial adherence to epithelial cells in bacillary colonization of the respiratory tract. Am. Rev. Respir. Dis. 121, 55-63, 1980.

Johnson, A.P., Taylor-Robinson, D., McGee, Z.A. Species specificity of attachment and damage to oviduct mucosa by Neisseria gonorrhoeae. Infec. Immun. 18, 833-839, 1977.

Kallenius, G., Winberg, J. Bacterial adherence to periurethral epithelial cells in girls prone to urinary-tract infections. Lancet 2, 540-543, 1978.

Krüger, Ch. Unveröffentlichte Daten, 1983.

Lampe, R.M., Mason, E.O., Kaplan, S.L., Umstead, C.L., Yow, M.D., Feigin, R.D. Adherence of Haemophilus influenzae to buccal epithelial cells. Infec. Immun. 35,1; 166-172, 1982.

Leffler, H., Svanborg-Edén, C. Chemical identification of a glycosphingolipid receptor for Escherichia coli attaching to human urinary tract epithelial cells and agglutinating human erythrocytes. Federation of European Microbiology Societies Microbiology Letters 8, 127-134, 1980.

Leffler, H., Svanborg-Edén, C. Glycolipid receptors for uropathogenic Escherichia coli on human erythrocytes and uroepithelial cells. Infec. Immun. 34,3; 920-929, 1981.

Loosli, C. Influenza and the interaction of viruses and bacteria in respiratory infections. Medicine (Baltimore) 52, 369-384, 1973.

Masafumi Nakao, Takeshi Nishi, and Kanji Tsuchiya. In vitro and in vivo morphological response of Klebsiella pneumoniae to cefotiam and cefazolin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 19,5; 901-910, 1981.

Morgan, R.L., Isaacson, R.E., Moon, H.W., Brinton, C.C., To, C.C. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic Escherichia coli-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987 or K99 pili: protection correlates with pilus homology of vaccine challenge. Infec. Immun. 22, 771-777, 1978.

Murray, H.W., Cohn, Z.A. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. J. Exp. Med. 152, 1596-1609, 1980.

Nagy, B., Moon, H.W., Isaacson, R.E., To, C.C., Brinton, C.C. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic Escherichia coli-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified pili. Infec. Immun. 21, 269-274, 1978.

Ofek, I., Mirelman, D., Sharon, N. Adherence of Escherichia coli to human mucosal cells mediated by mannose receptors. Nature 265, 623-625, 1977.

Ofek, I., Beachey, E.H., Eisenstein, B.I., Alkan, M.L., Sharon, N. Suppression of bacterial adherence by subminimal inhibitory concentrations of ß-lactam and aminoglycoside antibiotics. Rev. Infect. Dis. 1, 832-837, 1979.

Ofek, I., Beachey, E.H. Bacterial adherence, in: G.H. Stollerman [ed.]. Advances in internal medicine. Vol. 25. Year Book Medical Publishers, Chicago, 503-532, 1980.

Pan, Y.T., Schmitt, J.W., Sandford, B.A., Elbein, A.D. Adherence of bacteria to mammalian cells: inhibition by tunicamycin and streptovirudin. Journal of Bacteriology 139,2; 507-514, 1979.

Pido, V.V., Gonzales, H., Velasco, P.J. Unveröffentlichte Daten, 1976.

Punsalang, A.P., jr., Sawyer, W.D. Role of pili in the virulence of Neisseria gonorrhoeae. Infec. Immun. 8, 255-263, 1973.

Püschmann, S., Engelhorn, R. Pharmakologische Untersuchungen des Bromhexin Metaboliten Ambroxol. Arzneimittel-Forschung 28(I) 5a, 889-898, 1978.

Ramirez-Ronda, C.H. Adherence of Pseudomonas aeruginosa to normal and damaged canine aortic valves. Clin. Res. 26, 404 A, 1978 a.

Ramirez-Ronda, C.H.. Adherence of glucan-positive and glucan-negative streptococcal strains to normal and damaged heart valves. J. Clin. Invest. 62, 805-814, 1978 b.

Ramphal, R. In vitro and in vivo evidence for adherence-adhesion of some bacteria in the respiratory tract, in: Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1982.

Reifenrath, R. Persönliche Mitteilung, 1983.

Rietschel, E.Th. Die Bedeutung des Sauerstoffs bei der Abtötung von Mikroorganismen durch Phagozyten. Vortrag, 1978.

Rutter, J.M., Jones, G. W. Protection against enteric disease caused by Escherichia coli - a model for vaccination with a virulence determinant. Nature 242, 531-532, 1973.

Sandberg, T., Steqvist, K., Svanborg-Edén, C. Effects of subminimal inhibitory concentrations of ampicillin, chloramphenicol, and nitrofurantoin on the attachment of Escherichia coli to human uroepithelial cells in vitro. Rev. Infect. Dis. 1, 838-844, 1979.

Sanford, B.A., Shelokov, A., Ramsay, M.A. Bacterial adherence to virus-infected cells: a cell culture model of bacterial superinfection. J. Infect. Dis. 137, 176-181, 1978.

Sanford, B.A., Smith, N., Shelokov, A., Ramsay, M.A. Adherence of group B streptococci and human erythrocytes to influenza A virus-infected MDCK cells (40424). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160, 226-232, 1979.

Sato, Y., Izumiya, K., Oda, M.A., Sato, H. Biological significance of Bordetella pertussis fimbriae or hemagglutinin: a possible role of the fimbriae or hemagglutinin for pathogenesis and antibacterial immunity, in: C.R. Manclark and J. C. Hill [ed.]. International symposium on pertussis. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 51-57, 1979.

Sato, Y, Sato, H., Izumiya, K., Calwell, J.L., Manclark, C.R. Role of antibody to filamentous hemagglutinin and to leukocytosis promoting factor-hemagglutinin in immunity to pertussis, in: J.B. Robbins and J.C. Hill [ed.]. Bacterial vaccines. Decker, New York, 1981 (in press).

Satterwhite, T.K., DuPont, H.L., Evans, D.G., Evans, D.J., Jr. Role of Escherichia coli colonization factor antigen in acute diarrhoea. Lancet 2, 181-184, 1978.

Schaeffer, A.J., Amundsen, S.K., Jones, J.M. Effect of carbohydrates on adherence of Escherichia coli to human urinary tract epithelial cells. Infec. Immun. 30,2; 531-537, 1980.

Schmidt, B., Flesch, I., Ecker, B., Hovestadt, I., Ferber, E. Membrane phospholipid changes during macrophage activation. Agents and Actions, in press.

Scott, S.S., Old, D.C. Mannose-resistant and eluting (MRE) haemagglutinins, fimbriae and surface structure in strains of Haemophilus. FEMS Microbiology Letters 10, 235-240, 1981.

von Seefeld, H., Renovanz, H.-D. Das oberflächenaktive System der Lunge, eine Übersicht. Atemwegs- und Lungenkrankheiten 4, 1. Beiheft, 1-14, 1978.

Selinger, D.S., Reed, W.P., McLaren, L.C. Model for studying bacterial adherence to epithelial cells infected with viruses. Infec. Immun. 32, 941-944, 1981.

Sellwood, R., Gibbons, R.A., Jones, G.W., Rutter, J.M. Adhesion of enteropathogenic Escherchia coli to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes. J. Med. Microbiol. 8, 405-411,1975.

Siasco, R.E., Palillo, E.S. Unveröffentlichte Daten, 1979.

Siegal, M.S., Buchanan, T.M. Gonococcal pili: effect of preparation difference and alum on immunogenicity [abstract no. 421], in: Proceedings and Abstracts of the 20th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, 1980. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1980.

Silverblatt, F., Ofek, I. Influence of pili on the virulence of Proteus mirabilis in experimental hematogenous pyelonephritis. J. Infect. Dis. 138, 664-667, 1978.

Silverblatt, F.J., Dreyer, J.S., Schauer, S. Effect of pili on susceptibility of Escherichia coli to phagocytosis. Infec. Immun. 24, 218-223, 1979.

Silverblatt, F.J., Cohen, L.S. Antipili antibody affords protection against experimental ascending pyelonephritis. J. Clin. Invest. 64, 333-336, 1979.

Sobeslavsky, O., Prescott, B., Chanock, R.M. Adsorption of Mycoplasma pneumoniae to neuraminic acid receptors of various cells and possible role in virulence. J. Bacteriol. 96, 695-705, 1968.

Sugarman, B. Attachment of bacteria to mammalian surfaces. Infection 8,4; 132-141, 1980.

Svanborg-Edén, C., Hansson, H.A. Escherichia coli pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. Infec. Immun. 21, 229-237, 1978.

Svanborg-Edén, C., Sandberg, T., Stenqvist, K., Ahlstedt, S. Decrease in adhesion of Escherichia coli to human urinary tract epithelial cells in vitro by subinhibitory concentrations of ampicillin. Infection 6, 121-124, 1978.

Svanborg-Edén, C., Sandberg, T., Stenqvist, K., Ahlstedt, S. Effects of subinhibitory amounts of ampicillin, amoxycillin and mecillinam on the adhesion of Escherichia coli bacteria to human urinary tract epithelial cells: a preliminary study. Infection 7, Suppl. 5, 452-454, 1979.

Svanborg-Edén, C., Jodal, U. Attachment of Escherichia coli to urinary sediment epithelial cells from urinary tract infection-prone and healthy children. Infec. Immun. 26, 837-840, 1979.

Tratmont, E., Boslego, J., Sadoff, J., Zollinger, W., Brinton, C., Bryan, J., Labik, A. Safety and antigenicity study of a gonococcal pilus vaccine, in: J.D. Nelson and C. Grass [ed.]. Current chemotherapy and infectious diseases. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1240-1242, 1980.

Tweedy, J.M., Park, R.W.A., Hodgkiss, W. Evidence for the presence of fimbriae (pili) on Vibrio species. J. Gen. Microbiol. 51, 235-244, 1968.

Tylewska, S.A., Wadström, T., Hjertén, S. The effect of subinhibitory concentrations of penicillin and rifampicin on bacterial cell surface hydrophobicity and on binding to pharyngeal epithelial cells. Antimicrob. Agents Chemother. 17, 292-294, 1980.

Tylewska, S., Hjertén, S., Waldström, T. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on the adhesion of Streptococcus pyogenes to pharyngeal epithelial cells. Antimicrobial Agents And Chemotherapy 20,5; 563-566, 1981.

Väisänen, V., Lounatmaa, K., Korhonen, T.K. Effects of sublethal concentrations of antimicrobial agents on the hemagglutination, adhesion, and ultrastructure of pyelonephritogenic Escherichia coli strains. Antimicrobial Agents And Chemotherapy 22,1, 120-127, 1982.

Vosbeck, K., Handschin, H., Menge, E.-B., Zak, O. Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on adhesiveness of Escherichia coli in vitro. Rev. Infect. Dis. 1, 845-851, 1979.

Vosbeck, K., Bohn, J., Huber, U. Adhesiveness, hemagglutination and piliation of Escherichia coli grown in sub MIC concentrations of antibiotics. Experientia 36, 494, 1980.

Vosbeck, K., Mett, H., Huber, U., Bohn, J., Petignat, M. Effects of low concentrations of antibiotics on Escherichia coli adhesion. Antimicrobial Agents And Chemotherapy 21,6, 864-869, 1982.

Woods, D.E., Straus, D.C., Johanson, W.G., Jr., Berry, V.K., Bass, J.A. Role of pili in adherence of Pseudomonas aeruginosa to mammalian buccal epithelial cells. Infec. Immun. 29, 1146-1151, 1980.

Zähner, H. Persönliche Mitteilung, 1983.

Ziv, G. Persönliche Mitteilung, 1983.

LEBENSLAUF

| | |
|---|---|
| 1955 | am 29.01. in Biberach geboren. |
| 1962-1966 | evangelische Volksschule Biberach. |
| 1966-1974 | Wieland-Gymnasium Biberach. |
| 1974 | Abitur. |
| 1975 | Studium der Chemie an der Universität Tübingen. |
| 1976 | Studium der Biologie an der Universität Tübingen. |
| 1978 | Vordiplom in den Fächern Organische Chemie, anorganische Chemie, Physik, Zoologie, Botanik. |
| 1981 | Diplom in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie, Genetik, Parasitologie. |
| 1974-1982 | insgesamt 1 Jahr Industriepraktika, Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach. |
| 1982 | Anfertigung der Dissertation in der Abteilung Biologische Forschung/Mikrobiologie der Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen, und Herrn Priv.-Doz. Dr. R.G. Werner. |
| 1982 | Studienaufenthalt am MPI für Immunbiologie, Freiburg. |

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, C.F. Bardele, W. Bessler, V. Braun, U. Feine, F. Gönnenwein, K.G. Grell, J. Guglielmi, K.P. Hadeler, A. Hager, M. Hanack, V. Hemleben, C. Jönsson, G. Jung, E. Kallee, D. Krug, E. Lindner, W. Loeffler, D. Mecke, H. Netzel, F. Oberwinkler, K. Poralla, H. Probst, A. Rieker, B. Schwemmle, U. Seitz, W. Seyffert, U. Weber, G. Weitzel, P. Wenk, U. Weser, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Zähner